



**Universidade de Santiago de Compostela**

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

**ESTUDIO PROTEÓMICO DIFERENCIAL  
EN TEJIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO Y SUBCUTÁNEO  
DE PACIENTES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA**

Tesis Doctoral

Antonio Salgado Somoza

2011

ISBN 978-84-9887-763-2 (Edición digital PDF)



La Dra. Sonia Eiras Penas, Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, y el Prof. Dr. José Ramón González Juanatey, Jefe del Servicio de Cardiología y Unidad Coronaria del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN que:

El presente trabajo que lleva por título *“Estudio proteómico diferencial en tejido adiposo epicárdico y subcutáneo de pacientes con cardiopatía isquémica”*, realizado por Antonio Salgado Somoza en el Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela bajo nuestra dirección, ha sido revisado y está en disposición de ser presentado para optar al grado de Doctor en Biología.

La Directora de la Tesis:

El Director de la Tesis:

Fdo. Dra. S. Eiras

Fdo. Prof. Dr. J.R. González Juanatey





# AGRADECIMIENTOS

*Una de esas cosas que suelen suceder es que alguien diga “muchas gracias” y otro alguien responda “de nada”. Pero, realmente, los únicos que hacían muchas gracias de nada eran unos amigos argentinos. Cuando se agradece algo es porque se considera que la persona o personas a la/-s que va dirigido ese agradecimiento han hecho algo para merecerlo.*

*Por eso, quiero dar gracias, muchas gracias.*

*El primer y mayor GRACIAS que quiero escribir es para los más de cien pacientes sin los que no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Ellos son núcleo y periferia de todo este trabajo, su contribución es incalculable; me quedo sin palabras...*

*A mis padres. Porque ellos han hecho posible todo lo que soy a nivel académico y, en gran parte, a nivel personal. Mi esfuerzo es vuestro esfuerzo. Mis logros serán los vuestros.*

*Mi más sincero agradecimiento (más allá de los formalismos) a mis directores de tesis. Al Dr. José Ramón González Juanatey por acogerme en su grupo de investigación en el área de cardiología y, sobre todo, por contagiarnos a todos un poco de ese espíritu ambicioso. A la Dra. Sonia Eiras Penas, por darme la oportunidad de trabajar con ella en esta línea de investigación, a veces poco agradecida; pero fundamentalmente por ejercer de jefa a la vez que de amiga, lo cual no es nada fácil. Tú lo has hecho bien, espero no haberte decepcionado mucho como discípulo.*

*Mis compañeros del Laboratorio n°6 se merecen un hueco importante en este apartado. Ezequiel, eres un crack, me alegra mucho el haberte conocido. Siempre me ha sorprendido esa decisión a la hora de hacer cosas y nos lo hemos pasado pipa jugando pachangas (de lo cual tú tienes gran parte de culpa). Bruno, eres especial para tu bastón, ya lo sabes. Podrías aparecer en varios párrafos por ser compañero en múltiples facetas, espero que mantengas tu filosofía mucho tiempo y que te vaya bien, que digo bien, muy bien.*

*También quiero expresar un pequeño agradecimiento a la Dra. María Francisca Lago, por permitir mis inicios en esto de la investigación en su laboratorio, pero mayor agradecimiento merece el haber propiciado conocer a los dos mejores maestros que uno podría esperar en el mundillo: Chus y Rober. A ellos les debo la mayor parte de lo que sé con respecto a cómo moverme en un laboratorio.*

*Gracias a todos los compañeros que he tenido en el laboratorio, con los que he aprendido y compartido conocimientos, y si no eran conocimientos, pues cañas o un café. Ellos tienen gran importancia en el día a día de ese microambiente en el cual llegamos a juntar las noches de un mismo día. Como no quiero olvidarme de ninguno,*

os hago un agradecimiento general, aunque sí quiero hacer alguno particular sin motivar ningún tipo de ataque de celos...

A Martita (y Fran), la reina madre del cuerpo técnico, que sé que te va a ilusionar aparecer aquí cuando lo leas. Por los silbidos, la confianza y por acogerme (aunque ya sé que no es por mí). A Ruddy (y Ana) porque sin ti esto no sería lo mismo. A Sandrita (y Luis), por recoger al vagabundo de la parada del autobús y por las charlas que podrían ser interminables. A MeryNefro, que está pre-tésica y reivindicativa últimamente, pero que es un encanto. A Lens y Marina, porque otro tipo de jefes es posible... A Ángel y Helen por "dejarme robar" a mis anchas y perdón por ir a molestar. Al Dr. Carlos por traerme a casa y que lo pille el rádar, a María Lodeiro, Carlos y María Amil por las mañanas con olor a café.

A mis compañeros de la facultad, sobre todo a las Raqueles, Marián, Javis y especialmente a Zalo (que mira que hemos compartido tiempo y tiempo juntos...).

A mis amigos de siempre Pesky, Charly, Pinto, Marti, Saru, Manuvidu, Iván, Vichu, Pepe (grande Pepe) y Julito, que pase lo que pase están donde hace falta cuando se les necesita. (¡¡Un saludo también a mi gente de Velle!!) También a los "compañeros deportivos", que dando patadas y corriendo detrás de un balón me ayudaron a desconectar de la rutina.

Teri, que aunque a veces nos peleamos más que hablamos, sabes que te quiero mucho hermanita.

A Kira y Tico, que son los que están más que los amigos.

Y para el final..., para el final siempre se deja a alguien que es especial. A un tal Pitágoras se le atribuye la frase "escoge a una mujer de la cual puedas decir: hubiera podido escogerla más bella, pero no mejor". Pues bien, yo lo he conseguido. Y además ahora tengo la gran suerte de compartir contigo, Ro, lo más grande que tenemos, que es el ciclón concentrado al que llamamos Julia. Muchas gracias porque sin vosotras probablemente no lo habría logrado.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
<b>CAPÍTULO UNO: INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	3
<b>Cardiopatía isquémica</b> .....	5
<i>Aterosclerosis coronaria</i> .....	5
<i>Factores de riesgo</i> .....	9
<i>Inherentes al individuo</i> .....	10
<i>Relacionados con la conducta</i> .....	12
<i>Relacionados con el metabolismo. Síndrome metabólico</i> .....	12
<b>Obesidad</b> .....	14
<i>Anatomía del tejido adiposo</i> .....	16
<i>Fisiología del tejido adiposo</i> .....	18
<i>Tejido adiposo pardo</i> .....	18
<i>Tejido adiposo blanco</i> .....	19
<i>Tejido adiposo visceral</i> .....	21
<i>Fisiopatología del tejido adiposo</i> .....	22
<i>Regulación del metabolismo lipídico y glucídico</i> .....	23
<i>Adipoquinas y enfermedad</i> .....	25
<b>Tejido adiposo epicárdico</b> .....	27
<i>Origen</i> .....	27
<i>Anatomía</i> .....	30
<i>Fisiología</i> .....	32
<i>Fisiopatología del tejido adiposo epicárdico</i> .....	34
<i>Papel en obesidad e inflamación</i> .....	34
<i>Papel en la cardiopatía isquémica</i> .....	35
<b>Importancia de los estudios proteómicos y secretómicos</b> .....	37
<i>Proteómica</i> .....	39
<i>Secretómica</i> .....	41
<i>Espectrometría de masas</i> .....	42
<b>CAPÍTULO DOS: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	45
<b>CAPÍTULO TRES: METODOLOGÍA Y RESULTADOS I</b> .....	49
<b>Introducción al capítulo tres</b> .....	51
<b>Metodología I</b> .....	53
<b>Resultados I</b> .....	60
<i>2DE y Espectrometría de Masas</i> .....	60
<i>RT-PCR en Tiempo Real</i> .....	61
<i>Análisis de Western Blots e Inmunohistoquímica</i> .....	63
<i>Ensayo de estrés oxidativo</i> .....	64
<i>Inmunoprecipitación</i> .....	65

Discusión del capítulo tres.....	66
<b>CAPÍTULO CUATRO: METODOLOGÍA Y RESULTADOS II</b>	71
Introducción al capítulo cuatro .....	73
Metodología II .....	75
Resultados II.....	79
<i>Análisis mono-dimensional de la secreción del tejido adiposo</i>	79
<i>Secreción de APOA1, FABP4 y GSTP1</i> .....	85
<i>Expresión de proteína y de ARNm para APOA1, FABP4 y GSTP1</i> .....	85
<i>Relación entre la secreción de APOA1, GSTP1 y FABP4 y la cardiopatía isquémica</i> .....	87
<i>Análisis bi-dimensional relativo a la CI</i> .....	87
<i>Estudio de ARNm y proteína entre muestras CI/NCI</i> .....	88
Discusión del capítulo cuatro .....	90
<b>CAPÍTULO CINCO: METODOLOGÍA Y RESULTADOS III</b>	95
Introducción al capítulo cinco.....	97
Metodología III.....	99
Resultados III .....	102
<i>RBP4 en muestras de TAE y TAS</i> .....	102
<i>Diferencias en el patrón de secreción entre TAE y TAS</i> .....	104
Discusión del capítulo cinco .....	106
<b>CAPÍTULO SEIS: DISCUSIÓN GENERAL</b>	109
Proteoma y secretoma.....	111
Anatomía y fisiología del tejido adiposo epicárdico.....	124
Estrés oxidativo .....	129
Cardiopatía isquémica.....	133
Limitaciones del estudio .....	138
Resumen final .....	139
<b>CAPÍTULO SIETE: CONCLUSIONES</b>	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	145
<b>ABREVIATURAS</b> .....	173
<b>ANEXO 1. TABLA DE CEBADORES Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN</b> .....	176
<b>ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS GLOBALES LA POBLACIÓN USADA</b> .....	177
<b>ANEXO 3. PUBLICACIONES</b> .....	178

# CAPÍTULO UNO

## INTRODUCCIÓN GENERAL



## CAPÍTULO UNO: INTRODUCCIÓN GENERAL

### **Cardiopatía isquémica**

La cardiopatía isquémica es la enfermedad que causa mayor número de muertes e incapacidad en los países desarrollados. Se origina cuando el aporte de sangre y oxígeno a una parte del tejido miocárdico es insuficiente, manifestándose específicamente cuando existe un desequilibrio entre el aporte y la necesidad de oxígeno del tejido muscular cardíaco. Debido a su impacto en la sociedad y su alto coste monetario se revela como un buen candidato de estudio para la comunidad científica.

Una de las principales causas de isquemia miocárdica es el ataque aterosclerótico de una o varias arterias coronarias, lo cual conlleva una disminución localizada de la perfusión sanguínea. El defecto en el transporte de oxígeno y nutrientes provoca la muerte del tejido miocárdico afectado y un consecuente defecto en la función normal del corazón.

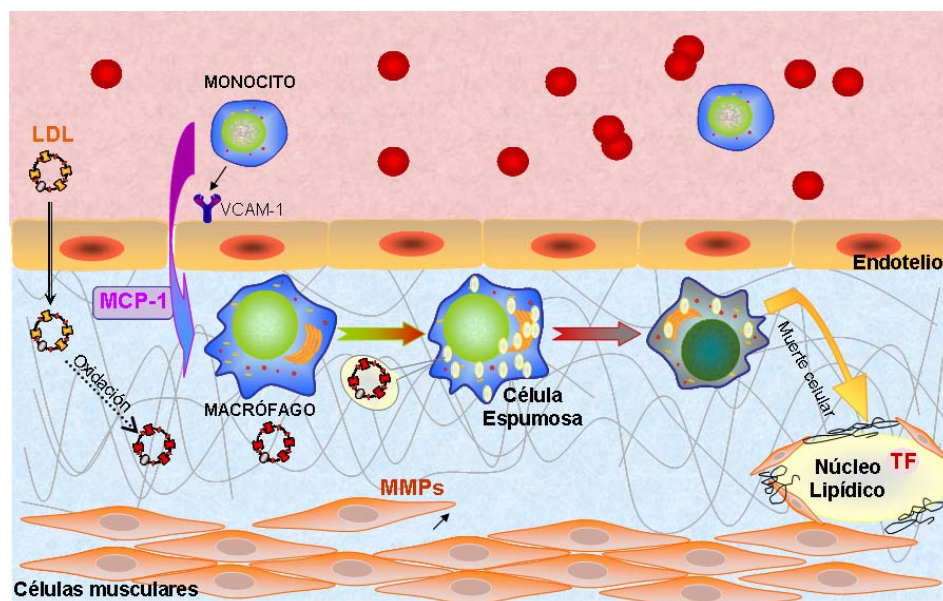
### ***Aterosclerosis coronaria***

Las arterias coronarias epicárdicas constituyen el sitio principal de la aterosclerosis, apareciendo de manera preferente en las ramificaciones de dichas arterias, que son regiones donde el flujo sanguíneo presenta mayor turbulencia [Frangos, Gahtan, *et al.* 1999]. La localización de la obstrucción va a determinar la cantidad de tejido miocárdico afectado y la gravedad de las manifestaciones clínicas. Así, las obstrucciones importantes de los vasos que irrigan al ventrículo izquierdo son especialmente peligrosas, ya que un infarto en esta zona podría comprometer la función de bombeo del corazón. Tras un infarto agudo de miocardio, la fracción de eyección ventricular izquierda es un importante predictor de mortalidad a largo plazo por causas cardíacas [Bigger, Fleiss, *et al.* 1984, Nicod, Gilpin, *et al.* 1988, Garcia Garcia, Serrano Sanchez, *et al.* 2000].

En una pared arterial normal se pueden distinguir tres capas concéntricas que rodean el lumen arterial (de dentro a fuera se denominan íntima, media y adventicia). Entre ellas existe una separación formada por dos capas de elastina (denominadas lámina elástica interna y externa). La íntima está revestida por una monocapa de células endoteliales, que se sitúan sobre una lámina basal de proteoglicanos y matriz extracelular y ejercen de barrera, tanto física como funcional, entre el flujo sanguíneo y

el estroma de la pared arterial. La media está constituida mayoritariamente por células musculares lisas dispuestas en capas cuyo número depende del tamaño de la arteria. Es habitual que aumente el contenido de elastina en las arterias de gran calibre para soportar los procesos de expansión y recuperación a los que se ven sometidas durante los movimientos de sístole y diástole. Por su parte, la adventicia consta de una mezcla de fibroblastos, células musculares, colágeno y una matriz laxa de elastina.

La progresión de la aterosclerosis (Figura 1) da lugar a una clasificación de varias etapas en las cuales se reflejan los primeros estadios de la patología, su progresión y el estadio maduro de la lesión [Stary, Blankenhorn, *et al.* 1992, Stary, Chandler, *et al.* 1994, Stary, Chandler, *et al.* 1995]. Así, la denominada estría grasa constituye la lesión inicial de la aterosclerosis. Esta alteración del endotelio vascular surge por la acumulación focal del contenido de lipoproteínas dentro de las regiones de la íntima, que permanecen en la pared arterial debido a su unión con los componentes de la matriz extracelular.



**Figura 1.** Esquema representativo de la progresión de la aterosclerosis. En las fases iniciales se produce una acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la íntima, que sufren modificaciones. La presencia de LDL oxidado provoca la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales que lleva a la adhesión de monocitos. Debido a la presencia de MCP-1, los monocitos atraviesan la pared vascular y se diferencian a macrófagos. La migración y secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por parte de las células musculares, da lugar a la formación de una matriz compleja que fomenta la retención del LDL. La captación de LDL oxidado por parte de los macrófagos provoca su transformación en células espumosas. La muerte de estas células lleva a la acumulación de depósitos lipídicos y de factor tisular (TF; un potente pro-coagulante), formando el núcleo de la lesión.



El siguiente paso sería el reclutamiento de leucocitos a la zona de lesión. Los tipos de células inflamatorias que aparecen en el ateroma incluyen macrófagos (derivados de monocitos) y linfocitos. En condiciones normales, las células endoteliales presentan resistencia a la adhesión de los leucocitos. Sin embargo, en condiciones patológicas, este reclutamiento se lleva a cabo mediante la expresión de moléculas de superficie por parte de las células endoteliales [Libby 2006]. La principal implicada es la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) que es capaz de unir monocitos y linfocitos T, precisamente los tipos celulares que se han encontrado en la placa aterosclerótica [Libby y Theroux 2005]. La presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidadas y citoquinas pro-inflamatorias, como la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) o el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), inducen la expresión de VCAM-1 a través de rutas mediadas por el factor de transcripción NF $\kappa$ B [Sever, Dahlof, *et al.* 2003].

Una vez adheridos, los monocitos necesitan cruzar la barrera formada por las células endoteliales mediante un proceso de diapédesis. Este proceso necesita un gradiente de quimioatrayentes, como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la cual parece ser la principal responsable [Randolph y Furie 1995]. En modelos animales de ratón, se observó una sobre-expresión de MCP-1 en la placa de ateroma, y la inhibición de su expresión o de su receptor (CCR2) provocan una reducción de las lesiones ateroscleróticas [Boring, Gosling, *et al.* 1998]. Posteriormente, los monocitos que alcanzan la íntima se transforman en macrófagos que expresan distintos receptores *scavenger* y captan las lipoproteínas modificadas. Los ésteres de colesterol se acumulan en el interior celular y los macrófagos se transforman en células espumosas [Libby 2006].

Los macrófagos también proliferan, al mismo tiempo que liberan citoquinas, lo que contribuye a mantener e incrementar la inflamación local. Ambas, maduración y proliferación, están mediadas por el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) que se encuentra sobre-expresado en la placa de ateroma [Clinton, Underwood, *et al.* 1992, Rosenfeld, Yla-Herttuala, *et al.* 1992]. Por otra parte, el reclutamiento de los linfocitos T se lleva a cabo mediante moléculas inducibles por interferón- $\gamma$  (IF $\gamma$ ), que interacciona con su receptor CXCR3 [Mach, Sauty, *et al.* 1999].

Se ha observado que en etapas tempranas del ateroma se produce una migración de células musculares lisas desde la túnica media a la íntima. Estas células proliferan y secretan metaloproteinasas de matriz (MMPs) en respuesta a varios

estímulos; ya sean oxidativos, autoinmunes, hemodinámicos o inflamatorios; provocando la formación de una matriz extracelular compleja [Libby 2008]. Algunos componentes de la matriz extracelular formada, especialmente los proteoglicanos, contribuyen a la retención de las apolipoproteínas y su posible modificación (donde cabe destacar la oxidación). Esta retención se produce fundamentalmente por la unión con la apolipoproteína B-100 (APOB-100), que es el componente principal de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [Yla-Herttuala, Solakivi, *et al.* 1987, Williams y Tabas 1995]. Una vez que las partículas de LDL se encuentran retenidas en la pared arterial, pueden formar agregados [Nivelstein, Fogelman, *et al.* 1991, Tamminen, Mottino, *et al.* 1999] que son ávidamente captados por los macrófagos y las células musculares, promoviendo la formación de células espumosas [Vijayagopal, Srinivasan, *et al.* 1992, Vijayagopal, Srinivasan, *et al.* 1993, Ismail, Alavi, *et al.* 1994a, Ismail, Alavi, *et al.* 1994b].

A medida que madura la lesión puede aparecer calcificación [Demer y Tintut 2008] y muerte celular apoptótica o necrótica [Stocker y Keaney 2004, Libby y Theroux 2005]. La muerte de las células espumosas da lugar al depósito de lípidos con una abundante acumulación de factor tisular (TF), formando el núcleo de la lesión aterosclerótica [Wilcox, Smith, *et al.* 1989, Stocker y Keaney 2004]. Este núcleo lipídico se encuentra encapsulado por una capa fibrosa formada por matriz extracelular y células musculares lisas.

La presencia de una placa aterosclerótica disminuye la luz de la arteria, pero no constituye el principal inconveniente en esta patología. El verdadero problema surge cuando se produce la rotura de la placa y el proceso de trombosis [Libby 2006]. De este modo, las lesiones ateroscleróticas maduras se definen como estables o vulnerables a rotura, que presentan diferencias en cuanto a la morfología. Así, las placas vulnerables tienen la capa fibrosa más fina, el núcleo lipídico más grande y mayor presencia de macrófagos [Tedgui y Mallat 2006].

En pacientes con infarto agudo de miocardio se ha visto que la inflamación juega un papel central en el desencadenamiento de la rotura de la placa [van der Wal, Becker, *et al.* 1994]. Conjuntamente con el grosor mencionado, la capa fibrosa debe su consistencia y estabilidad al colágeno intersticial. Esta molécula, está producida por las células musculares y su expresión se ve estimulada por los factores de crecimiento transformante- $\beta$  (TFG $\beta$ ) y derivado de plaquetas (PDGF) [Amento, Ehsani, *et al.* 1991].

La integridad de esa capa fibrosa está afectada por la inflamación de dos maneras: inhibiendo su creación y destruyendo el colágeno existente [Libby 2006].

La presencia de linfocitos T y mastocitos en la placa participa en el deterioro de la capa fibrosa de colágeno mediante la producción de moléculas como el IF $\gamma$ , el ligando de CD40, IL-1 y TNF $\alpha$ . Todas estas citoquinas inflamatorias aumentan la producción de diversas metaloproteinasas de matriz, como MMP-1, MMP-8 y MMP-13, que degradan el colágeno existente [Amento, Ehsani, *et al.* 1991, Saren, Welgus, *et al.* 1996, Horton, Libby, *et al.* 2001]. Algunas de ellas, como es el caso del ligando de CD40, promueven además la síntesis de TF por parte de los macrófagos [Mach, Schonbeck, *et al.* 1997]. La rotura de este tipo de placa y la exposición de los componentes del interior de la pared vascular, unidos a que TF en presencia del factor VII del complemento es un potente pro-coagulante, provoca la formación de un trombo. La aparición del trombo, en la luz de la coronaria afectada, desencadena el taponamiento de la arteria y el consecuente daño isquémico.

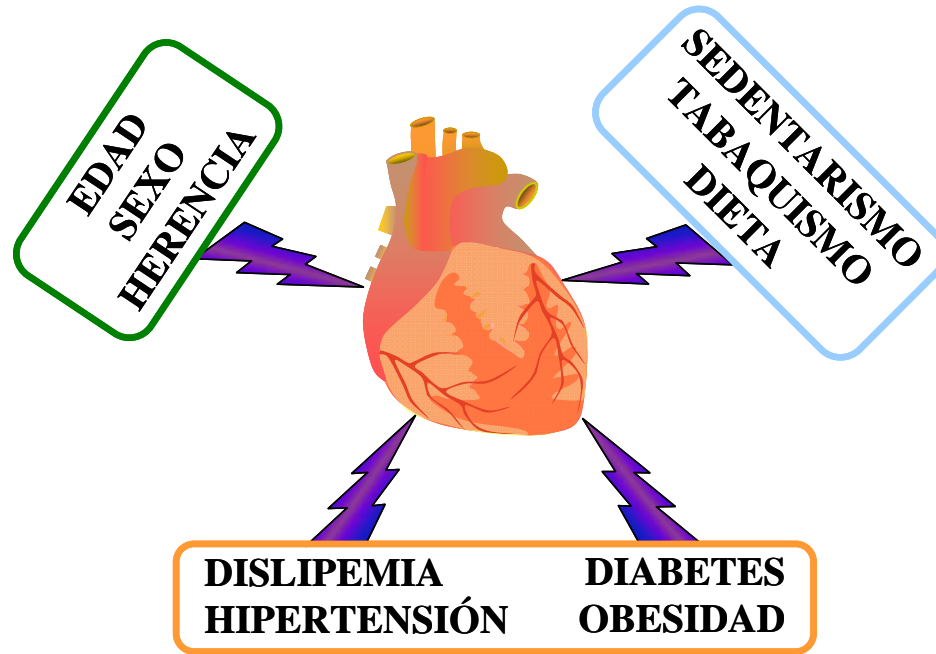
### **Factores de riesgo**

Diversos estudios epidemiológicos han denotado que la cardiopatía isquémica se presenta íntimamente relacionada con el estilo de vida, aunque existen otros factores que aumentan el riesgo de sufrir isquemia miocárdica.

Se define factor de riesgo como aquella circunstancia o situación que aumenta la probabilidad de que un individuo sufra una determinada enfermedad. En el contexto de la cardiopatía isquémica los principales factores de riesgo cardiovascular se pueden agrupar en tres grandes grupos (Figura 2): los derivados de la cualidad del individuo (edad, sexo y antecedentes familiares) que no son controlables y por lo tanto son difícilmente tratables, los relacionados con la conducta (sedentarismo, tabaquismo y dieta) y los relacionados con el metabolismo (dislipemia, hipertensión, *diabetes mellitus* y obesidad). A las patologías que conforman este último grupo de factores se las agrupa dentro del denominado síndrome metabólico.

A continuación se muestra un pequeño desglose de cada uno; pero cabe tener en cuenta que, aunque aparezcan por separado, existe una gran inter-relación entre ellos.

## FACTORES DE RIESGO



**Figura 2.** Resumen gráfico de los principales factores de riesgo implicados en la cardiopatía isquémica, dispuestos según los tres grandes grupos descritos.

### *Inherentes al individuo*

Edad. Es uno de los factores de riesgo que, pese a no ser modificable, es uno de los más importantes. De hecho, el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular a los 30 años es muy inferior a la de que esta aparezca a partir de los 60 [Oxenham y Sharpe 2003]. Con la edad se produce una progresiva elongación y dilatación de las principales arterias así como un incremento en el grosor y rigidez en las mismas [Lakatta 2000]. Estos cambios se ven reflejados a nivel microscópico por un incremento del grosor de la íntima, hipertrofia del músculo liso vascular y un aumento de colágeno en las paredes arteriales [Lakatta 1987, Joyner 2000], cambios que conllevan la aparición de hipertensión arterial.

Sexo. En España, las enfermedades isquémicas del corazón causan el 9,3% del total de defunciones, siendo la primera causa de muerte en hombres (10,2%) y la segunda en mujeres (8,3%); según datos demográficos de 2008 publicados por el Instituto Nacional de Estadística. Existen numerosos estudios observacionales en los

cuales se ha demostrado que los hombres presentan un riesgo mayor de sufrir enfermedad cardiovascular que mujeres de la misma edad [Wake y Yoshiyama 2009]. Aunque tras la menopausia, la probabilidad en las mujeres aumenta hasta igualar a la de los hombres. Debido a este fenómeno se ha intentado utilizar terapia basada en estrógenos para intentar reducir la aterosclerosis coronaria, pero no se ha observado una disminución de la incidencia de la enfermedad tras el tratamiento en mujeres postmenopáusicas [Hulley, Grady, *et al.* 1998].

Antecedentes familiares. Un factor clave que indica la presencia de un componente genético para la aterosclerosis es el “agrupamiento familiar” de la cardiopatía isquémica. Así, la fuerza de asociación entre enfermedad coronaria e historia parental es similar a la encontrada para otros factores como hipertensión o hipercolesterolemia, y el riesgo de que aparezca la enfermedad se dobla si hay antecedentes de cardiopatía isquémica a una edad temprana en un familiar directo [Lloyd-Jones, Nam, *et al.* 2004]. La heredabilidad estimada en gemelos es de un 57% para hombres y 38% para mujeres [Zdravkovic, Wienke, *et al.* 2002]. Estudios en individuos adoptados, que mueren por causas naturales a una edad inferior a 65 años, han mostrado un riesgo de muerte alto en padres biológicos mientras que en padres adoptivos parece no haber efecto [Petersen, Nielsen, *et al.* 2002]. Asimismo, se han encontrado mutaciones en genes (relacionados con hipertensión, diabetes y otros factores como el estrés oxidativo o la calcificación arterial) que predisponen a los individuos a sufrir una enfermedad cardiovascular.

Como se ha mencionado, existen también distintas patologías que asocian la genética con la dislipemia. Por una parte, está la hipercolesterolemia familiar, que es un desorden autosómico dominante que provoca aumento de LDL en sangre de 2-5 veces en los heterocigotos frente a 4-6 veces en homocigotos. La mayoría de los pacientes que sufren esta enfermedad hereditaria han experimentado un infarto de miocardio a los 60 años, reduciéndose esta edad en 15 años cuando se toman sólo los homocigotos [Stocker y Keaney 2004]. Por otra parte, en la enfermedad de Tangier se produce una ausencia de los niveles de colesterol unidos a lipoproteínas de alta densidad (HDL) debido a un defecto en la proteína *ATP binding cassette transporter-1* (ABCA1), que está implicada en la salida de colesterol al exterior celular. Los pacientes que presentan esta enfermedad autosómica recesiva muestran un síndrome de acumulación de

colesterol en los tejidos, caracterizado por amígdalas hipertrofiadas, neuropatía y, en algunas tribus, enfermedad coronaria [Oram 2000].

Por ello, dado el componente poligénico de la enfermedad coronaria, la búsqueda e identificación de los factores genéticos que influyen en la cardiopatía isquémica podría ser importante y está siendo motivo de estudio, con el objetivo de desarrollar estrategias de prevención e intervención de la enfermedad [Padmanabhan, Hastie, *et al.* 2010].

#### *Relacionados con la conducta*

*Sedentarismo.* El nivel de actividad física es un predictor robusto e independiente del riesgo de sufrir enfermedad coronaria, incluso ajustando por marcadores inflamatorios y otros parámetros como la circunferencia de cintura [Rana, Arsenault, *et al.* 2011]. Así, los individuos con circunferencias de cintura bajas mantienen elevado el riesgo de enfermedad coronaria si tienen un estilo de vida sedentario comparando con individuos activos [Arsenault, Rana, *et al.* 2010].

*Tabaquismo.* Estudios recientes dictaminan que el consumo de tabaco aumenta las enfermedades ateroscleróticas en un 50%, doblando la incidencia de la cardiopatía isquémica. Hoy en día se sabe que fumar está causalmente relacionado con la enfermedad coronaria y que dejar de fumar resulta efectivo para disminuir el riesgo de padecer la enfermedad. De hecho, el riesgo de infarto de miocardio es bastante parecido entre un no-fumador y un exfumador, siempre que hayan transcurrido al menos dos años desde el momento de dejar el hábito [Stocker y Keaney 2004].

*Dieta.* Datos recientes sugieren que no es necesario eliminar de la dieta ciertos nutrientes considerados tradicionalmente como perjudiciales. Éste es el caso del consumo moderado de huevos, café, chocolate y frutos secos. Además, dietas como la mediterránea y la oriental presentan ciertas cualidades saludables que deberían de ser incluidas en la alimentación diaria para evitar la aparición de la enfermedad coronaria [Pryde y Kannel 2011].

#### *Relacionados con el metabolismo. Síndrome metabólico*

El síndrome metabólico se refiere a la ocurrencia simultánea de varios factores de riesgo cardiovascular relacionados con el metabolismo en un mismo individuo [Grundy, Cleeman, *et al.* 2005]. Su definición ha cambiado en la última década pero siempre girando en torno a unas características comunes [Reaven 2011].

Para determinar que un individuo padece síndrome metabólico debe presentar al menos tres de los siguientes criterios (que varían dependiendo del organismo que halla dictado los mismos): dislipemia (niveles séricos de triglicéridos  $\geq 150$ mg/dL o de colesterol HDL  $< 35$ -40 [ $\sigma$ ]/ $< 39$ -50 [ $\varphi$ ]mg/dL), hipertensión arterial ( $> 130/85$ mmHg o  $\geq 140/90$ mmHg), diabetes (ya sea resistencia a insulina, hiperinsulinemia, glucosa plasmática en ayuno  $\geq 100$ mg/dL o intolerancia a la glucosa) y obesidad (principalmente obesidad central determinada como circunferencia de cintura  $\geq 94$ -102 [ $\sigma$ ]/80-89 [ $\varphi$ ]cm, relación cintura/cadera  $> 0,90$  [ $\sigma$ ]/0,85 [ $\varphi$ ] o IMC  $> 30$ kg/m<sup>2</sup>) [Alberti y Zimmet 1998, Balkau y Charles 1999, Grundy, Cleeman, *et al.* 2005, Zimmet, Magliano, *et al.* 2005, Huang 2009]. Se ha propuesto como criterio a la microalbuminuria, pero normalmente sólo se utiliza con el subgrupo de pacientes diabéticos [Laaksonen, Lakka, *et al.* 2002]. Del mismo modo, otros criterios han sido sugeridos (como los desórdenes en la cascada de coagulación, la disfunción endotelial, el exceso de ácido úrico en sangre y los niveles de leptina elevados) pero se han quedado fuera de la definición general de síndrome metabólico [Huang 2009].

Las conexiones entre los distintos factores de riesgo metabólico no se comprenden totalmente en la actualidad y parecen ser complejas. El alto grado de asociación que presentan hace muy difícil separar las contribuciones de cada uno de estos factores al riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular.

Dislipemia. Las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos libres son características implicadas en la patogénesis de la dislipemia y están fuertemente asociadas con el síndrome metabólico [Kirk y Klein 2009]. El desequilibrio en los patrones lipídicos (aumento de LDL y descenso de HDL en sangre) es utilizado de manera rutinaria en la consulta para determinar el riesgo cardiovascular. En la población general, el hecho de que el LDL elevado es un factor de riesgo cardiovascular está apoyado por la acción de las estatinas, que reducen el colesterol LDL y disminuyen las manifestaciones de la aterosclerosis de manera considerable [Gotto y Grundy 1999]. La acción de las estatinas se lleva a cabo por la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, que es el principal enzima implicado en la síntesis hepática de colesterol [Maron, Fazio, *et al.* 2000, Zhou y Liao 2009]. El bloqueo de este enzima provoca además un aumento secundario de HDL en sangre, que presenta una relación

inversa con la aterosclerosis [Gordon, Castelli, *et al.* 1977, Yamashita, Tsubakio-Yamamoto, *et al.* 2010].

Los niveles de triglicéridos en sangre han sido estudiados en diversos estudios epidemiológicos prospectivos, para demostrar su relación con la incidencia de la enfermedad cardiovascular [Assmann, Schulte, *et al.* 1998, Austin, Hokanson, *et al.* 1998]. Pese a que existe alguna discrepancia [Hulley, Rosenman, *et al.* 1980], la importancia de esta relación ha sido puesta de manifiesto por varios metanálisis que han determinado que un exceso de triglicéridos constituye un factor independiente de riesgo de sufrir coronariopatía [Assmann, Schulte, *et al.* 1998, Austin, Hokanson, *et al.* 1998].

**Hipertensión.** Se define a la hipertensión arterial como la presencia de presión sistólica superior a 140mmHg o diastólica superior a 90mmHg. Las personas de edad avanzada son particularmente propensas a presentar un cuadro de hipertensión [Nichols, O'Rourke, *et al.* 1985]. De hecho, aproximadamente 3 de cada 4 personas mayores de 75 años tienen hipertensión. Parece haber una correlación lineal entre la elevación de la presión sanguínea y la incidencia de enfermedad aterosclerótica vascular. La naturaleza de la asociación entre hipertensión y enfermedad cardiovascular está apoyada por el hecho de que la probabilidad de sufrir un infarto o un accidente cerebrovascular se ve significativamente reducida con terapia anti-hipertensiva [He y Whelton 1999].

**Diabetes mellitus.** El riesgo de sufrir aterosclerosis coronaria aumenta entre tres y cinco veces cuando el individuo sufre diabetes independientemente de otros factores de riesgo [Pyorala, Laakso, *et al.* 1987]. Desde otro punto de vista, las enfermedades cardiovasculares explican alrededor del 70% de las muertes entre la población diabética [Haffner, Lehto, *et al.* 1998, Ali, Narayan, *et al.* 2010] y la tasa de mortalidad tras un infarto de miocardio en población diabética es más alta que en individuos no diabéticos [Abbott, Donahue, *et al.* 1988, Miettinen, Lehto, *et al.* 1998]. Aunque es frecuente encontrar otros factores de riesgo asociados a diabetes como dislipemia o hipertensión, existe una pequeña influencia de estos cofactores sobre el aumento del riesgo mediado por diabetes de que se produzca aterosclerosis coronaria [Stocker y Keaney 2004].

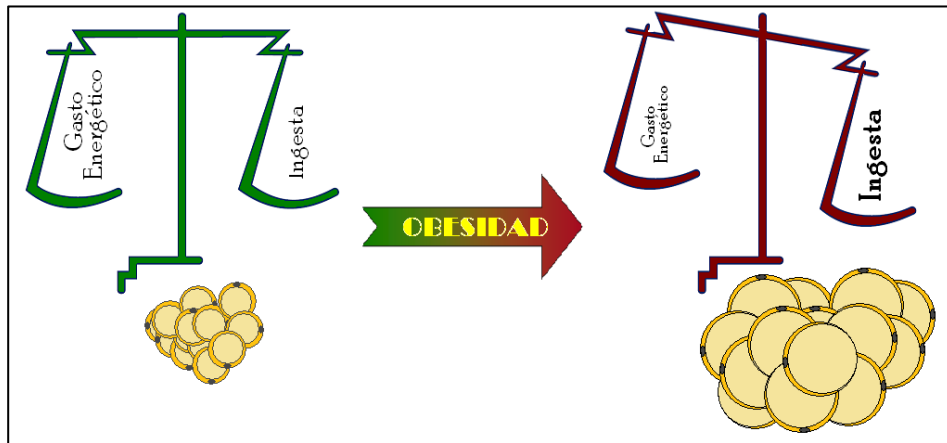
## **Obesidad**

Además de los indicados anteriormente, cabe destacar a la obesidad como uno de los principales factores de riesgo, tanto del conjunto de las enfermedades



cardiovasculares como específicamente de la cardiopatía isquémica. Es el elemento más común en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio, ya que más de dos tercios de los pacientes con enfermedad coronaria tienen sobrepeso u obesidad [Romero-Corral, Montori, *et al.* 2006, Lopez-Jimenez y Cortes-Bergoderi 2011]. El mecanismo que soporta la relación entre obesidad y enfermedad cardiovascular no se ha dilucidado todavía, quizás debido a la aparición conjunta de la obesidad con varios factores del síndrome metabólico como la hipertensión o la diabetes.

La dimensión casi epidémica que está alcanzando la obesidad en el mundo la ha convertido en un factor de riesgo muy preocupante. Se podría definir obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede resultar perjudicial para la salud y se desencadena fundamentalmente debido a un problema del balance energético del individuo. Aparece cuando la ingesta es superior al gasto energético, entendido éste como metabolismo basal más energía consumida durante la actividad física (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la aparición de la obesidad.

El problema de la obesidad se ha tratado durante años con un abordaje sobre los mecanismos neuroendocrinos mediados por el control hipotalámico de la ingesta de alimento y también por los mecanismos que producían cambios de gasto energético, restándole importancia al tejido adiposo. Sin embargo, los procesos de hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo constituyen esencialmente el reflejo de la patología en el individuo.

Como se ha comentado anteriormente, la obesidad está asociada con varios problemas que a menudo se agrupan bajo el nombre de síndrome metabólico [Reaven

2011]. La enfermedad coronaria, en concreto, también presenta una asociación con la obesidad y pese a que está parcialmente mediada por factores de riesgo tradicionales (como hipertensión, dislipemia y *diabetes mellitus*), éstos no explican totalmente la asociación. Recientemente, en un estudio realizado a partir de dos cohortes prospectivas con casi 120000 individuos seguidos durante 16 años, se ha demostrado que el riesgo de sufrir enfermedad coronaria está fuertemente asociado con el exceso de peso por sí solo o en combinación con otras co-morbilidades tanto en hombres como en mujeres [Flint, Hu, *et al.* 2010].

La aterosclerosis coronaria probablemente se inicia o acelera por diversos mecanismos que se encuentran potenciados por la obesidad, como el aumento del tono simpático, de la concentración de ácidos grasos libres circulantes, del volumen intravascular con aumento asociado del estrés en la pared vascular, inflamación y cambios en las lipoproteínas que las hacen más aterogénicas [Lopez-Jimenez y Cortes-Bergoderi 2011]. Es posible que otras circunstancias relacionen obesidad y enfermedad cardiovascular, como la apnea obstructiva del sueño, probable mediador de esta asociación [Lopez-Jimenez, Sert Kuniyoshi, *et al.* 2008]; el estado pro-trombótico en sujetos con obesidad, que podría contribuir al inicio de eventos coronarios agudos [Scarabin, Vissac, *et al.* 1996]; o la resistencia a insulina, particularmente en individuos con síndrome metabólico [Sierra-Johnson, Romero-Corral, *et al.* 2009].

### ***Anatomía del tejido adiposo***

El tejido adiposo es un tejido heterogéneo y esto constituye una característica importante. Así, este tejido no sólo está constituido por adipocitos, sino que aproximadamente el 50% de las células que lo componen son de otro tipo, entre las que se encuentran pre-adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos. Dentro de los adipocitos maduros se encuentran diferencias que dan lugar a la existencia de dos tipos, pardos y blancos.

Los adipocitos pardos son células poligonales, con un diámetro que varía entre 20-40µm [Avram, Avram, *et al.* 2005]. Los lípidos almacenados en su interior se encuentran dispuestos en múltiples gotas multiloculares [Napolitano y Fawcett 1958]. Presentan un núcleo situado en el centro del citoplasma y una alta cantidad de mitocondrias de gran tamaño y con numerosas crestas.

Los adipocitos blancos son esféricos, y su diámetro varía entre 30-70µm dependiendo del depósito graso al que pertenezcan [Avram, Avram, *et al.* 2005]. Presentan una gran gota de grasa unilocular [Napolitano 1963], cuyo tamaño puede sobrepasar los 50µm y que ocupa la mayor parte del espacio intracelular. Debido a su presencia, el citoplasma se encuentra comprimido formando un anillo y el núcleo se encuentra en una posición excéntrica.

Dependiendo del tipo de adipocitos maduros que formen al tejido adiposo, se puede diferenciar dos tipos principales de tejido adiposo según su morfología y, principalmente, su fisiología. La diferencia más llamativa a nivel morfológico se debe al color, ya que mientras el tejido adiposo pardo es de color marrón, el tejido adiposo blanco es de color amarillo o marfil [Avram, Avram, *et al.* 2005]. Ambos tejidos están capilarizados e inervados. Sin embargo, el tejido adiposo pardo está más vascularizado [Cinti 2005] y las fibras noradrenérgicas que llegan a él no se confinan a la pared de los capilares, sino que interactúan directamente con los adipocitos pardos por medio de sinapsis “accidentales” [De Matteis, Ricquier, *et al.* 1998, Avram, Avram, *et al.* 2005].

Aún así, la morfología no es siempre suficiente para determinar ambos tipos de tejidos. Los adipocitos pardos pueden aparecer uniloculares y los blancos con aspecto multilocular en ausencia de estímulos o bajo condiciones de ayuno, respectivamente [Himms-Hagen 2001, Avram, Avram, *et al.* 2005]. En la actualidad, se ha determinado que el método más preciso para detectar la presencia de adipocitos pardos es la cuantificación del ARNm que codifica para la proteína desacoplante 1 (UCP-1). La expresión de dicho gen ha sido puesta de manifiesto en muestras de tejido adiposo blanco, con lo que se puede concluir que existen adipocitos pardos en estos depósitos [Garruti y Ricquier 1992, Oberkofler, Dallinger, *et al.* 1997, Cannon y Nedergaard 2004]. Asimismo, bajo ciertas condiciones puede ocurrir un fenómeno de trans-diferenciación de adipocitos blancos a pardos, lo cual desecha la posibilidad de que estos dos tipos celulares provengan de precursores distintos [Himms-Hagen 2001, Tiraby, Tavernier, *et al.* 2003].

Otra de las características importantes del tejido adiposo es su distribución, ya que a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de órganos, se halla distribuido por todo el cuerpo en múltiples depósitos. En mamíferos, se ha demostrado la existencia de al menos 15 depósitos de grasa distintos, que presentan diferencias en cuanto al volumen de los adipocitos que los forman [Pond, Mattacks, *et al.* 1993, Barber, Ward,

*et al.* 2000]. La heterogeneidad existente entre las distintas localizaciones de grasa corporal añade así un nivel mayor de complejidad a este tejido.

### ***Fisiología del tejido adiposo***

La fisiología del tejido adiposo depende en gran medida de la composición celular del mismo en términos de los diferentes adipocitos maduros que presente. A continuación se muestra una breve introducción sobre las principales funciones de cada uno de estos tejidos.

#### ***Tejido adiposo pardo***

La función principal del tejido adiposo pardo es la regulación de la temperatura corporal mediante el proceso de termogénesis. Existen dos categorías principales de termogénesis [Himms-Hagen 2001]: la obligatoria (que es necesaria y está siempre presente) y la facultativa (que puede presentarse dependiendo de las circunstancias). Este último tipo incluye la producción de calor voluntaria (ejercicio) o involuntaria (durante períodos de inquietud), la inducida por dieta y la inducida por frío (con o sin la presencia de escalofríos). A la regulación térmica corporal, además del tejido adiposo pardo, contribuye también el tejido muscular.

La activación de la producción de calor (sin la presencia de escalofríos) durante la aclimatación al frío, provoca un crecimiento hiperplásico e hipertrófico del tejido adiposo pardo así como un aumento de su contenido mitocondrial y de la proteína UCP-1 [Lowell y Spiegelman 2000, Cannon y Nedergaard 2004]. La termogénesis en este tejido también se activa durante procesos de estrés fisiológico o vulnerabilidad, como ocurre durante el periodo postnatal y el comienzo de los estados febriles [Avram, Avram, *et al.* 2005].

La tasa de termogénesis mediada por UCP-1 está bajo control del sistema nervioso simpático [Lowell y Spiegelman 2000], pero también es regulada por otros estímulos como los ácidos grasos libres y el ácido retinoico [Klingenberg y Huang 1999, Rial, Gonzalez-Barroso, *et al.* 1999, Tomas, Jimenez-Jimenez, *et al.* 2004, Avram, Avram, *et al.* 2005]. En humanos han sido identificadas otras 4 isoformas de proteínas desacoplantes de las cuales las más estudiadas son UCP-2 y UCP-3. Esta familia de proteínas ha sido relacionada con numerosos procesos como la inflamación, regulación del peso corporal, envejecimiento y la prevención de la formación de especies reactivas del oxígeno y de la aterosclerosis [Jezek, Zackova, *et al.* 2004].

El tejido adiposo pardo también parece desempeñar un papel como órgano secretor de manera autocrina, paracrina y endocrina. Los productos secretados por los adipocitos pardos incluyen proteínas de membrana basal, factores de crecimiento, ácidos grasos, óxido nítrico, etc. Bajo condiciones de atrofia, podrían ser secretadas moléculas como leptina, adiponectina y resistina [Cannon y Nedergaard 2004]. Aún así, debido a la escasa entidad del tejido adiposo pardo en adultos, parece que el papel que pueda jugar a nivel endocrino sea de poca relevancia, excepto para aquellos factores que son abundantemente expresados.

#### *Tejido adiposo blanco*

La principal tarea del tejido adiposo blanco (a partir de ahora será denominado simplemente tejido adiposo) es la de almacenar energía en forma de triglicéridos, aunque también se le han asignado funciones como aislante térmico, como protector de otros órganos frente al daño mecánico y como órgano endocrino [Kershaw y Flier 2004].

Adaptativamente, el almacenamiento de energía por largos períodos de tiempo resulta más rentable en forma de lípidos frente a glúcidos puesto que proporcionan mayor energía ( $39,1\text{kJg}^{-1}$  frente a  $15,4\text{--}17,5\text{kJg}^{-1}$ ) y se pueden almacenar sin necesidad de agua [Trayhurn 2007]. Así, el almacenamiento de energía a largo plazo procedente de la diferencia ingesta-consumo es almacenada por el individuo en forma de triglicéridos en el tejido adiposo.

La formación de triglicéridos en el tejido adiposo proviene de dos fuentes principales: glúcidos o lípidos. En cuanto al metabolismo de la glucosa cabe destacar que el tejido adiposo, junto con los músculos esquelético y cardíaco, son los únicos tejidos que expresan el receptor de glucosa inducible por insulina GLUT4 [Avram, Avram, *et al.* 2005]. Dentro de los adipocitos y por medio de la ruta glucolítica, la glucosa proporciona el sustrato para la síntesis de ácidos grasos y glicerol, que se combinarán en proporción 3:1 para formar triglicéridos.

El metabolismo de lípidos en los adipocitos está controlado por tres funciones principales: captación de ácidos grasos, lipogénesis y lipólisis. En la captación de ácidos grasos juega un papel importante la lipoproteína lipasa (LPL), que libera los ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes, especialmente de los quilomicrones que se forman tras la ingesta [Mead, Irvine, *et al.* 2002]. Posteriormente se produce la entrada de los ácidos grasos en la célula por un mecanismo que todavía plantea dudas, pero que

probablemente depende de la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) o de CD36. Una vez en el interior del adipocito es transportada por la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) [Clarke y Armstrong 1989, Hertz y Bernlohr 2000] y entra en contacto con la ruta adipogénica.

En la adipogénesis existen numerosos enzimas implicados, pero cabe destacar la acetil coenzima A carboxilasa (ACC1) y la sintasa de ácidos grasos (FAS), cuya expresión ha sido observada en tejido adiposo humano [Large, Peroni, *et al.* 2004]. Los ácidos grasos sintetizados de novo son utilizados para la síntesis de triglicéridos producida por una serie de esterificaciones sucesivas [Large, Peroni, *et al.* 2004].

Durante el período de ayuno, se produce una liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo. Esta liberación se lleva a cabo tras la hidrólisis de la gota de grasa contenida en el interior del adipocito. El enzima limitante en esta reacción es la lipasa sensible a hormonas (HSL) cuya actividad está controlada por fosforilación y traslocación [Langin, Holm, *et al.* 1996]. La traslocación de la HSL se produce por interacción con las perilipinas, proteínas que rodean a la gota de grasa, y pone en contacto a la lipasa con su sustrato. Otros enzimas implicados en este proceso son la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo (ATGL), también conocida como desnitrina, y la monoglicérido lipasa (MGL) [Large, Peroni, *et al.* 2004].

Cuantitativamente, los ácidos grasos constituyen la mayor parte de la secreción de los adipocitos, que se liberan al torrente sanguíneo principalmente durante el ayuno [Trayhurn 2007]. Por este motivo, el tejido adiposo ha sido considerado tradicionalmente un reservorio pasivo de energía. Pero los adipocitos secretan otras moléculas lipídicas además de ácidos grasos, ya sean sintetizadas en su interior (como el caso de los prostanoïdes) [Trayhurn 2007] o moléculas que no sintetiza pero que almacena hasta su liberación (como el colesterol o el retinol) [Tsutsumi, Okuno, *et al.* 1992, Verghese, Arrese, *et al.* 2007].

En 1987 se identificó al tejido adiposo como el principal lugar para el metabolismo de hormonas esteroïdes [Siiteri 1987] y la producción de adipina [Cook, Min, *et al.* 1987], un factor endocrino que está disminuido de manera marcada en obesidad. La posterior identificación y caracterización de leptina en 1994 [Zhang, Proenca, *et al.* 1994] estableció firmemente al tejido adiposo como un órgano endocrino y se ratificó en este papel cuando en los años siguientes varios grupos identificaron

adiponectina como una adipoquina liberada por el tejido adiposo [Scherer, Williams, *et al.* 1995, Hu, Liang, *et al.* 1996, Maeda, Okubo, *et al.* 1996].

Hoy en día se conoce que el tejido adiposo expresa y secreta péptidos bioactivos, globalmente denominados adipoquinas, que son diversos en cuanto a su estructura y función fisiológica y que actúan tanto a nivel sistémico como local [Kim y Moustaid-Moussa 2000, Kershaw y Flier 2004, Galic, Oakhill, *et al.* 2010]. Bajo el término adipoquinas se incluyen citoquinas clásicas, factores de crecimiento, proteínas del sistema del complemento y proteínas implicadas en la regulación de la presión sanguínea, homeostasis vascular, metabolismo de glúcidos y lípidos y angiogénesis [Trayhurn 2007]. Además de las mencionadas anteriormente la lista de adipoquinas se ha engrosado en los últimos años. Así, se conoce la secreción por parte del tejido adiposo de apelina [Tatemoto, Hosoya, *et al.* 1998], resistina [Steppan, Bailey, *et al.* 2001, Rajala, Lin, *et al.* 2002], visfatina [Fukuhara, Matsuda, *et al.* 2005, Fukuhara, Matsuda, *et al.* 2007], omentina [Schaffler, Neumeier, *et al.* 2005, Yang, Lee, *et al.* 2006], vaspina [Hida, Wada, *et al.* 2005, Kloting, Berndt, *et al.* 2006], proteína de unión al retinol 4 (RBP4) [Yang, Graham, *et al.* 2005], quemerina [Bozaoglu, Bolton, *et al.* 2007, Goralski, McCarthy, *et al.* 2007, Roh, Song, *et al.* 2007], etc.

Pero además de estas señales eferentes, el tejido adiposo expresa numerosos receptores que le permiten responder a señales aferentes. Así, a pesar del repertorio biológico para almacenar y liberar energía, el tejido adiposo contiene la maquinaria necesaria para permitir la comunicación necesaria con órganos distantes y con el sistema nervioso central. El tejido adiposo expresa receptores para hormonas (*e.g.* receptor de insulina), catecolaminas (*e.g.* receptores  $\beta$ -adrenérgicos), péptidos natriuréticos (NPRA) y otras moléculas (*e.g.* el receptor de TNF $\alpha$ ) [Kershaw y Flier 2004]. A través de esta red interactiva, el tejido adiposo está implicado de manera integrada en la coordinación de una serie de procesos biológicos incluyendo metabolismo energético, función neuroendocrina y función inmune.

#### *Tejido adiposo visceral*

Hasta la fecha, los depósitos grasos mejor caracterizados son el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo visceral, particularmente con respecto a su contribución a la enfermedad cardiovascular. Desde mediados del siglo XX se reconoce una relación entre la distribución de la grasa corporal y la aterosclerosis [Vague 1956]. No fue hasta la década de los 80 cuando se demostró que el ratio cintura-cadera era el mejor

predictor, tanto para enfermedad cardiovascular como para mortalidad, de manera independiente de los demás métodos comúnmente utilizados para medir la obesidad [Larsson, Svardsudd, *et al.* 1984]. Así, en contra de lo que se pudiese pensar, la acumulación de grasa subcutánea está considerada como grasa “buena” (aunque en vez de buena sería más correcto decir que es “la menos mala”) cuando se realiza la comparación con la grasa visceral.

El tejido adiposo visceral supone el 10-15% de toda la grasa corporal de un individuo y sus peculiares características le hacen especialmente interesante en cuanto a su posible implicación patogénica. La captación de glucosa y lípidos por el tejido adiposo, así como la movilización lipídica es mayor en el compartimento visceral que en el subcutáneo [Marin, Andersson, *et al.* 1992, Virtanen, Lonnroth, *et al.* 2002].

Los depósitos de grasa exhiben patrones de expresión y secreción únicos. Por ejemplo, la expresión y secreción de visfatina, IL-6 y PAI-1 son relativamente mayores en el tejido adiposo visceral, mientras que las concentraciones de adiponectina y leptina son mayores en el tejido adiposo subcutáneo. Los depósitos de tejido adiposo visceral y subcutáneo también muestran patrones de expresión de receptores que influyen en su capacidad de responder a señales aferentes. Ejemplos de ello son la expresión de los receptores AT1,  $\beta$ -3-adrenérgico, glucocorticoide y de andrógenos que son expresados en mayor medida en el tejido adiposo visceral [Kershaw y Flier 2004].

Estos datos indican que el papel metabólico del tejido adiposo visceral podría ser más activo que el del tejido adiposo subcutáneo a nivel local. Por otra parte, dado que el volumen del tejido adiposo subcutáneo es 4 veces superior al visceral, parece sugerir una mayor influencia del primero en el metabolismo glucídico y lipídico a nivel sistémico.

### ***Fisiopatología del tejido adiposo***

La diferencia observada en el riesgo de enfermedad entre los distintos depósitos grasos podría estar debida a las diferencias en su función secretora. Así, los mecanismos de incremento en la actividad de la cascada de coagulación y descenso de la cascada fibrinolítica, inflamación, estrés oxidativo, disfunción endotelial y alteraciones en la homeostasis de glúcidos y lípidos podrían estar debidos a la acción de mediadores procedentes del tejido adiposo [Darvall, Sam, *et al.* 2007].



Tradicionalmente se ha tomado como medida de obesidad el IMC; pero existen medidas alternativas, principalmente centradas en la denominada obesidad central, que han sido sugeridas como mejores predictores del riesgo cardiovascular. Estas medidas son la circunferencia de cintura, la circunferencia de cadera, el ratio cintura:cadera y el ratio cintura:altura [Huxley, Mendis, *et al.* 2010]. Por otra parte, el desarrollo de las técnicas de imagen como la tomografía computerizada (TC) y la resonancia magnética (RM) ha permitido a los investigadores cuantificar de manera precisa la acumulación de tejido adiposo localizado en varios compartimentos de la cavidad abdominal [Sjostrom, Kvist, *et al.* 1986, Gray, Fujioka, *et al.* 1991, Iacobellis 2005, Tchernof 2007], pudiendo estimar las áreas de tejido adiposo visceral y subcutáneo a partir de los planos obtenidos con estas técnicas de imagen.

Los estudios HOPE (*Heart Outcomes Protection Evaluation*) e INTERHEART en 2005 o EPIC-Norfolk en 2007, han demostrado que la cintura de cadera o el ratio cintura:cadera son predictores independientes para la enfermedad cardiovascular, el infarto de miocardio o la mortalidad por cualquier causa [Dagenais, Yi, *et al.* 2005, Yusuf, Hawken, *et al.* 2005, Canoy, Boekholdt, *et al.* 2007] en individuos delgados u obesos. Concretamente, un análisis reciente a partir de la cohorte de pacientes Framingham, ha asociado el tejido adiposo visceral con un incremento de la cardiopatía isquémica [Mahabadi, Massaro, *et al.* 2009].

Sin embargo, la ausencia total de tejido adiposo se asocia con formas graves de resistencia a insulina, debido a su papel como depósito lipídico bajo condiciones normales [Scherer 2006].

#### *Regulación del metabolismo lipídico y glucídico*

La mayoría de las anormalidades dramáticas en el metabolismo de los ácidos grasos libres se produce cuando se suprime la relación entre su concentración y la lipólisis del tejido adiposo. Una liberación excesiva de ácidos grasos por parte del tejido adiposo (con su correspondiente elevación de la concentración en plasma) puede deteriorar la capacidad de la insulina para estimular la captación de glucosa en el músculo esquelético y suprimir su producción en el hígado, aumentando también la producción hepática de triglicéridos [Kirk y Klein 2009]. Un efecto final similar se observa con la ausencia de tejido adiposo, ya que al desaparecer este “almacén especializado” también se provoca la desregulación de los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres.

Un incremento anormal en la concentración de triglicéridos en plasma incrementa la transferencia de estos entre las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las HDL. Así, se desencadena un aumento en el aclaramiento de las HDL disminuyendo su concentración en plasma [Hopkins y Barter 1986]. El principal regulador de la actividad lipolítica del tejido adiposo, principal contribuyente a las concentraciones de ácidos grasos libres plasmáticos, es la insulina. En individuos obesos existe un aumento de insulina típico que no puede ser compensado por la resistencia a insulina del tejido adiposo, lo cual provoca que en estos individuos aparezcan unas tasas basales elevadas de ácidos grasos libres [Horowitz y Klein 2000, Kirk y Klein 2009].

El estado lipotóxico contribuye a la exposición del sistema cardiovascular a un exceso de ácidos grasos libres, deteriorando los procesos metabólicos dependientes de insulina. El deterioro de este sistema, lleva a un estado de hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDL en sangre y alteraciones cardiovasculares [Gastaldelli y Basta 2010]. También podría activar la producción de especies reactivas del oxígeno en los vasos sanguíneos [Shimabukuro 2009], provocando disfunción endotelial y la liberación de citoquinas amplificando la resistencia a insulina, lipólisis e inflamación en todo el tejido adiposo. De este modo, se provoca un descenso en la oxidación lipídica en los tejidos distintos del adiposo. Esto provoca una acumulación ectópica de lípidos, que contribuye a la lipotoxicidad y aumenta todavía más la resistencia a insulina [Lionetti, Mollica, *et al.* 2009].

La acumulación de grasa en tejidos distintos del adiposo se asocia con un incremento en la producción de glucosa, principalmente vía gluconeogénesis, que es liberada al torrente sanguíneo [Bays, Mandarin, *et al.* 2004, Gastaldelli y Basta 2010]. Esto contribuye a un aumento en la producción y acumulación de productos de glicación avanzada (conocidos como AGEs) que están implicados en la patogénesis de muchas enfermedades asociadas con la edad; incluyendo diabetes, aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer [Baynes y Thorpe 2000].

Los AGEs y el LDL oxidado han sido asociados con la patogénesis de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes. La modificación de proteínas y lípidos por AGEs incrementan de manera natural a medida que aumenta la edad de los individuos, acelerándose el proceso durante la hiperglicemia [Dyer, Dunn, *et al.* 1993]. Los niveles de AGE se encuentran elevados de manera significativa en pacientes con

grandes cantidades de grasa visceral y en general con la acumulación de grasa en tejidos distintos del adiposo [Gastaldelli y Basta 2010]. Estudios en modelos de rata han demostrado que una dieta rica en grasas eleva los niveles de AGE en suero, hígado y corazón, lo que sugiere que el daño tisular provocado por la dieta rica en grasas se debe en parte a la acumulación de AGEs [Li, Liu, *et al.* 2005].

La interacción de los AGEs con su receptor celular principal (RAGE) está implicada en el desarrollo de complicaciones vasculares [Basta, Lazzerini, *et al.* 2002]. RAGE se encuentra en todas las células relevantes para la aterosclerosis, como las células endoteliales, macrófagos, linfocitos, células musculares lisas y ha sido recientemente descubierto también en tejido adiposo [Ueno, Koyama, *et al.* 2010]; lo cual sugiere que RAGE juega un papel relevante en la patología vascular. Los mecanismos moleculares del eje AGE-RAGE implicados en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares han sido determinados solamente de manera parcial. La consecuencia patológica más importante de este eje es la inducción de estrés oxidativo a través del sistema NADPH oxidasa y la mitocondria [Basta, Lazzerini, *et al.* 2005]. Además de ello, el aumento del estrés oxidativo favorece la reacción de formación de AGEs (reacción de Maillard), desencadenando un aumento de su concentración y provocando así un proceso de retroalimentación [Miyata, Sugiyama, *et al.* 2001, Hartog, Voors, *et al.* 2007].

#### *Adipoquinas y enfermedad*

La importante función endocrina del tejido adiposo está enfatizada por las consecuencias metabólicas adversas del exceso o deficiencia de tejido adiposo. El hecho de que los adipocitos sean células secretoras hace del tejido adiposo el mayor órgano endocrino de todo el cuerpo, ya que en individuos delgados constituye un 20% del total del peso corporal, cifra que se eleva a más del 50% en individuos obesos [Trayhurn 2007]. De este modo, pequeños cambios en el metabolismo de estas células, podrían tener un impacto potencial muy grande a nivel del organismo.

Pese a que los adipocitos expresan y secretan varias hormonas endocrinas como son leptina y adiponectina, cabe destacar que algunas proteínas secretadas son derivadas de la fracción no adipocitaria del tejido adiposo [Fain, Madan, *et al.* 2004]. A pesar de ello, estos componentes funcionan como una unidad integrada haciendo del tejido adiposo un auténtico órgano endocrino [Frayn, Karpe, *et al.* 2003]. Las funciones endocrinas del tejido adiposo se engloban en dos amplios grupos: 1) proteínas

secretadas que tienen efectos sobre células o tejidos distantes y 2) enzimas envueltos en el metabolismo de hormonas esteroideas.

De todas las adipoquinas, leptina ha sido la estudiada más profundamente. Sus funciones son diversas, entre las que se incluyen la regulación del metabolismo energético y el peso corporal (disminuyendo el apetito y aumentando el consumo de energía) [Zhang, Proenca, *et al.* 1994]. En individuos obesos también se ha observado un aumento de otras adipoquinas, como apelina, resistina, RBP4, IL-6 y TNF $\alpha$ , mientras que adiponectina aparece disminuida.

Se ha hallado una relación de leptina con hipertensión en modelos animales, aunque esta relación no está del todo clara en humanos [Stenvinkel 2000, Brook, Bard, *et al.* 2007]. Adiponectina está relacionada también con la presión arterial, ya que su expresión génica es menor en individuos hipertensos [Adamczak, Wiecek, *et al.* 2003].

Conjuntamente con la regulación del metabolismo, las adipoquinas liberadas por el tejido adiposo juegan un papel en los procesos de inflamación. De esta manera, el tejido adiposo libera mediadores tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. En cuanto a las adipoquinas inflamatorias cabe destacar el papel de leptina, resistina, visfatina IL-6, TNF $\alpha$  y MCP-1. Por otro lado, las adipoquinas que participan en las respuestas anti-inflamatorias son principalmente la IL-10 y la adiponectina. Debido al componente inflamatorio existente en las enfermedades del aparato cardiovascular así como en alguno de sus factores de riesgo (obesidad, tabaquismo, resistencia a insulina...) se ha comprobado el efecto de varias adipoquinas sobre este tipo de patologías [Fearon y Faux 2009].

Recientemente, ha sido publicado el estudio multicéntrico PRIME sobre adipoquinas y enfermedad coronaria, que ha demostrado que la proteína C-reactiva (PCR) y la IL-6 son predictores independientes de enfermedad coronaria. Este estudio prospectivo se ha basado en muestras de sangre de más de 10000 pacientes de distintos ambientes sociales y con edades comprendidas entre los 50 y los 59 años, a los que se les ha realizado un seguimiento a 10 años [Luc, Empana, *et al.* 2010]. Los niveles de adiponectina se han visto inversamente asociados con los niveles de estos dos marcadores de riesgo cardiovascular (Engeli, Feldpausch *et al.* 2003).

Como se ha indicado anteriormente, la disposición de los depósitos grasos es de gran importancia. Las adipoquinas derivadas del tejido adiposo subcutáneo son secretadas a la circulación sistémica, pudiendo afectar al individuo a nivel global. Las

procedentes del tejido adiposo visceral son secretadas en el sistema portal, confiriéndoles un efecto relativamente mayor en cuanto a la regulación del metabolismo hepático. Un ejemplo de esta acción local del tejido adiposo visceral, lo proporciona el hecho de que la acumulación de grasa visceral se ha visto relacionada con la resistencia a insulina y esteatosis hepáticas [Tchernof 2007]. No obstante, se ha hallado una correlación entre el tejido adiposo visceral medido por tomografía computerizada con varios parámetros metabólicos a nivel corporal. Este es el caso del estado dislipémico, resistencia a insulina, la eliminación de la glucosa plasmática [Pouliot, Despres, *et al.* 1992, Despres, Lemieux, *et al.* 2008]. También se asocian los niveles de este depósito de grasa con marcadores pro-trombóticos o de inflamación, como la PCR, IL-6 y TNF $\alpha$  [Hotamisligil 2000, Wajchenberg 2000, Lemieux, Pascot, *et al.* 2001].

De tal manera, mientras que los mecanismos precisos que expliquen las diferencias entre tejidos no están todavía esclarecidas, esta heterogeneidad funcional entre los depósitos grasos sugiere que el tejido adiposo podría no ser un órgano endocrino, sino más bien un conjunto de órganos endocrinos similares entre sí pero únicos.

### **Tejido adiposo epicárdico**

El tejido adiposo epicárdico se ha englobado dentro del tejido adiposo visceral debido a su posición rodeando al corazón. Recientemente ha suscitado el interés de varios grupos de investigación, pero todavía no ha sido estudiado tan en profundidad como el tejido adiposo visceral abdominal o el tejido adiposo subcutáneo. Al igual que cualquier otro tejido adiposo, el tejido adiposo epicárdico podría funcionar como almacén lipídico, como órgano endocrino o como tejido inflamatorio secretando adipoquinas y quimioquinas.

### ***Origen***

El epicardio es la capa epitelial más externa del corazón maduro en vertebrados que se encuentra en contacto con el líquido de la cavidad pericárdica y al igual que el tejido miocárdico tiene origen mesodérmico. Más concretamente, el epicardio es una monocapa de mesotelio conectada con el miocardio mediante una capa de tejido conectivo subepicárdico [Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001].

Durante el transcurso de la historia, la visión sobre el origen del epicardio ha pasado por varias hipótesis. La más antigua se debe a un autor desconocido, pero aparece en la literatura desde el último tercio del siglo XIX. Postula que el epicardio y el miocardio provienen ambos del epitelio externo original del tubo cardíaco primitivo, que recibe el nombre de mioepicardio o epimiocardio [Streeter 1949, Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001].

Tras las observaciones microscópicas de esta estructura primigenia se ha llegado a la conclusión de que no podía ser cierto, ya que sólo estaba compuesta por células mioblásticas. Así, el embriólogo suizo Wilhelm His postuló que las células del epicardio provenían del endocardio, sufriendo una migración de dentro a fuera y colonizando la superficie del corazón [Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001]. Ya en el siglo XX se originó la tercera teoría, según la cual el epicardio derivaría de unas protuberancias vellosas del mesotelio pericárdico cubriendo la pared central del seno venoso, la cual se atribuye al histólogo Tadeusz Kurkiewicz [Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001]. Al igual que ocurrió en otros momentos de la historia de la biología, los descubrimientos de Kurkiewicz quedaron en la sombra hasta que fueron redescubiertos 50 años más tarde.

El mérito de estos autores era el de obtener conclusiones con la tecnología utilizada, que tras la aparición de la microscopía electrónica facilitó la caracterización minuciosa del origen de esta estructura. A finales de los 60, Manasek confirmó que el epicardio no provenía del mioepicardio y que este sólo estaba constituido por células mioblásticas. Los resultados de los estudios posteriores confirmaron la hipótesis de Kurkiewicz acerca del origen extracardiaco del epicardio [Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001, Muñoz-Chapuli, Macias, *et al.* 2002].

Las protuberancias del mesotelio pericárdico han sido identificadas como la principal fuente extracardiaca del epicardio en embriones de varias especies de vertebrados siendo denominadas órgano proepicárdico [Poelmann, Gittenberger-de Groot, *et al.* 1993]. Entre las distintas especies observadas existen algunas variaciones en cuanto a su estructura y posición. Debido a que el epicardio también recibe células de la porción profunda de la pared pericárdica adyacente, se ha propuesto el término serosa proepicárdica para englobar toda la región de la pared pericárdica (cercana al seno venoso), que contribuye en el desarrollo del corazón [Manner 1999].

En mamíferos, la serosa proepicárdica ha sido descrita en varios modelos así como en humanos [Hirakow 1992]. En embriones humanos no existen sólo protuberancias vellosas cerca del seno venoso, sino que se han encontrado unas pocas vellosidades pericárdicas en el techo de la cavidad pericárdica, cerca del saco aórtico. Se ha postulado que estas estructuras puedan contribuir a la formación del epicardio que cubre a las grandes arterias [Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001].

En trabajos con embriones de ratón se ha visto que las células de la serosa proepicárdica alcanzan el corazón en forma de agregados de fenotipo vesicular que flotan de manera pasiva hasta colocarse sobre la superficie desnuda del miocardio. Al alcanzar esta superficie, se aplanan a modo de parches de epicardio aislados que posteriormente se fusionan formando una capa de células coherente [Komiya, Ito, *et al.* 1987]. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales se produce este proceso no están bien determinados.

La cobertura de la superficie del corazón comienza por la superficie dorsal de los ventrículos primitivos, luego cubre las superficies dorsales de las aurículas y los tractos de salida y las superficies lateral y ventral de los ventrículos. En último lugar se cubren el techo de las aurículas y la superficie ventral del tracto de salida [Manner, Perez-Pomares, *et al.* 2001].

La serosa proepicárdica no proporciona cardiomioblastos al corazón primitivo, pero, para la correcta formación del miocardio, podría ser necesaria la presencia de las células derivadas del proepicardio. En estudios *in vitro* sobre miocitos primarios de ventrículo de rata se ha observado que la adición al cultivo de células del epicardio frenan e incluso revierten la desdiferenciación que sufren los miocitos, proceso que parece ser dependiente de contacto directo o aposición de estos dos tipos celulares, pues no es posible conseguir este efecto mediante la utilización de medio condicionado [Eid, Larson, *et al.* 1992].

El epicardio embrionario expresa el enzima retinaldehído deshidrogenada tipo 2 (RALDH2), que es uno de los principales implicados en la síntesis de ácido retinoico. Este dato sugería que el ácido retinoico derivado de las células del epicardio jugaba un importante papel en la morfogénesis normal de los tejidos miocárdicos subyacentes [Xavier-Neto, Shapiro, *et al.* 2000]. Estudios recientes en embriones de pollo han demostrado que el ácido retinoico retrasa la diferenciación de las células musculares lisas de las coronarias con respecto a las células endoteliales. Este hecho es muy

importante en la morfogénesis de los vasos coronarios, que se desarrollan a partir de células derivadas del epicardio que ocupan el espacio subepicárdico tras una transición epitelio mesénquima [Azambuja, Portillo-Sanchez, *et al.* 2010].

Otro papel importante de las células proepicárdicas es la inducción y diferenciación del sistema de conducción cardíaco, ayudando al reclutamiento de células miocárdicas para su diferenciación en células de Purkinje. Así, cuando se altera el epicardio de embriones de pollo se observa una afectación de las fibras de Purkinje sin que se produzcan malformaciones graves del corazón más allá de una reducción en su tamaño [Eralp, Lie-Venema, *et al.* 2006].

### **Anatomía**

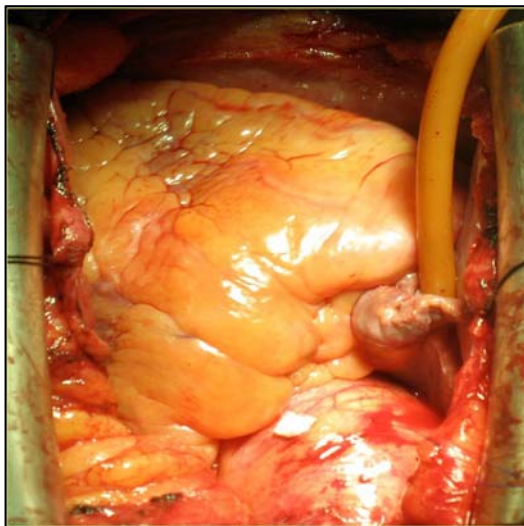
La grasa que se encuentra en el corazón se presenta en tres depósitos: epicárdico, pericárdico e intracelular. Se denomina tejido adiposo epicárdico al tejido adiposo localizado en la superficie epicárdica del corazón. La cantidad de grasa que se encuentra rodeando al corazón es variable entre individuos y además, no se encuentra en todas las especies animales, ni siquiera en todos los mamíferos. Mientras que las ratas (*Rattus norvegicus*) y los ratones (*Mus musculus*) de laboratorio prácticamente no presentan grasa epicárdica, si que se han encontrado abundantes depósitos en cobayas (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y grandes mamíferos, además de humanos [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005]. La ausencia de tejido adiposo epicárdico en algunas especies contradice la idea de que este tejido sea de una importancia crítica para la función del corazón adulto o confiera protección mecánica frente a traumatismos.

En el corazón humano adulto, el volumen medio de tejido adiposo epicárdico según estudios poblacionales varía desde  $68 \pm 34 \text{ cm}^3$  hasta  $124 \pm 50 \text{ cm}^3$ . Aunque no todos los estudios están de acuerdo [Corradi, Maestri, *et al.* 2004], el volumen graso es mayor en hombres ( $137 \pm 54 \text{ cm}^3$ ) que en mujeres ( $108 \pm 41 \text{ cm}^3$ ) y se incrementa a medida que avanza la edad del individuo [Reiner, Mazzoleni, *et al.* 1955, Tansey, Aly, *et al.* 2005, Rabkin 2007, Verhagen y Visseren 2011]. En un estudio realizado sobre autopsias de 30 pacientes, Shirani y colaboradores determinaron que el tejido adiposo epicárdico constituía un porcentaje entre 4 y 52% del corazón (media de  $20 \pm 11\%$ ) siendo también mayor en hombres que en mujeres ( $130 \pm 104 \text{ g}$  frente a  $83 \pm 55 \text{ g}$ ). De este modo, le confiere flotabilidad en agua al 40% de los corazones estudiados, lo cual indica un aumento marcado de tejido adiposo que cubría más de  $\frac{3}{4}$  de la circunferencia media



cardíaca [Shirani, Berezowski, *et al.* 1995]. En cuanto a la diferencia de género también cabe destacar que la variabilidad en la cantidad de grasa epicárdica es más alta en hombres (~15-25%) que en mujeres (~20-22%) según datos de distintos estudios revisados por Rabkin [Rabkin 2007].

El tejido adiposo epicárdico se encuentra en las cavidades atrio-ventricular e inter-ventricular extendiéndose hacia el ápex. A medida que aumenta la acumulación de grasa, se llena progresivamente el espacio inter-ventricular llegando incluso a cubrir toda la superficie epicárdica [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005] (Figura 4). Presenta una disposición asimétrica ya que la mayor cantidad de grasa se dispone sobre la pared lateral del ventrículo derecho [Tansey, Aly, *et al.* 2005]. Esta característica podría explicarse por el hecho de que la pared del ventrículo izquierdo es mucho más gruesa, lo que dificultaría la difusión libre de los ácidos grasos entre las paredes miocárdicas y la capa de grasa adyacente.



**Figura 4.** La fotografía muestra el campo quirúrgico en un paciente sometido a cirugía coronaria que presentaba gran acumulación de tejido adiposo epicárdico.

El ratio grasa/músculo cardíaco es 0,15-0,17g (♂-♀) para el ventrículo izquierdo y 0,48-0,61g (♂-♀) para el ventrículo derecho, lo cual supone un porcentaje considerable del volumen del corazón debido a la diferencia peso/volumen de ambos tejidos [Corradi, Maestri, *et al.* 2004]. También se puede observar en menor medida con una localización subepicárdica en las paredes libres de la aurícula y rodeando los dos apéndices. Una pequeña cantidad de tejido adiposo se localiza desde la superficie epicárdica hasta el interior del miocardio siguiendo la adventicia de las arterias coronarias, que son las encargadas de la irrigación sanguínea del tejido adiposo epicárdico [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005].

Una característica anatómica del tejido adiposo epicárdico en cuanto a su morfología reside en el hecho de que los adipocitos que lo constituyen son de un tamaño

inferior a los que forman parte del tejido adiposo de otras localizaciones [Sons y Hoffmann 1986, Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2010].

Pero sin duda, el rasgo más importante de la anatomía del tejido adiposo epicárdico viene determinado por la ausencia de estructuras anatómicas que lo separen de las arterias coronarias [Sacks y Fain 2007]. Su proximidad con las coronarias y el miocardio subyacente sugiere enérgicamente la posibilidad de que este tejido podría presentar un importante papel en la patogénesis de la cardiopatía isquémica.

### ***Fisiología***

Dada la poca magnitud de este depósito graso no parece probable que juegue un papel a nivel del metabolismo corporal, pero sus características anatómicas le confieren un más que posible papel fisiológico localizado.

La mayoría de las funciones fisiológicas del tejido adiposo epicárdico están basadas en datos observacionales y especulaciones, dada la dificultad de hacer medidas directas así como la ausencia de esta grasa en modelos animales típicos como la rata y el ratón [Marchington, Mattacks, *et al.* 1989, Rabkin 2007].

Los cobayas son un modelo animal considerado aceptable para estudiar las características que presenta este tejido y su relación con el miocardio y las arterias coronarias [Swifka, Weiss, *et al.* 2008]. Se ha propuesto que el tejido adiposo tiene un efecto protector. Así, Marchington y colaboradores han observado en cobayas que el tejido adiposo epicárdico presenta una actividad lipogénica y lipolítica duplicadas con respecto a otros depósitos de grasa [Marchington, Mattacks, *et al.* 1989, Marchington y Pond 1990]. La exposición a un exceso de ácidos grasos provoca toxicidad. En este caso, el tejido adiposo epicárdico podría proteger al corazón frente al exceso de ácidos grasos captándolos de la circulación coronaria [Marchington, Mattacks, *et al.* 1989, Kong y Rabkin 2000, Kong y Rabkin 2002].

La composición lipídica del tejido adiposo epicárdico también difiere de la de otros compartimentos grasos como el subcutáneo. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por Pezeshkian y colaboradores, que encontraron que los ácidos grasos saturados, como el ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico (14:0, 16:0 y 18:0, respectivamente), se presentaban en mayor concentración en el tejido adiposo epicárdico mientras que los ácidos grasos insaturados, incluyendo el ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico (16:1n-7, 18:1n9, 18:2n-6 y 18:3n-3,

respectivamente), se presentaban en mayor concentración en el tejido adiposo subcutáneo [Pezeshkian, Noori, *et al.* 2009].

La alta tasa lipolítica de la grasa epicárdica hace que en momentos de alta demanda sirva como un reservorio local de energía, en forma de ácidos grasos, para el músculo cardíaco [Marchington, Mattacks, *et al.* 1989, Marchington y Pond 1990]. Asimismo, este mismo autor también ha observado que el tejido adiposo epicárdico en monos tenía una menor tasa de utilización de glucosa que la grasa intra-abdominal [Marchington, Mattacks, *et al.* 1989]. Aunque estos descubrimientos están aceptados de manera general, existen datos en otros modelos animales que parecen estar en desacuerdo con esta observación [Barber, Ward, *et al.* 2000].

Las arterias coronarias están rodeadas de grasa epicárdica [Keegan, Gatehouse, *et al.* 2004], con lo cual también se ha propuesto que esta grasa pueda protegerlas frente a la torsión inducida por la onda de pulso arterial y la contracción cardíaca, o para compensar los cambios rápidos en el diámetro de los vasos sanguíneos [Rabkin 2007].

Otra función del tejido adiposo epicárdico podría tener que ver con el remodelado coronario, con lo cual se sugiere un efecto deletéreo de la presencia de este tejido. Si un vaso coronario estuviese rodeado por el miocardio, que es prácticamente incompresible, tendría limitada su capacidad para expandirse y acomodar una placa aterosclerótica. Así, resulta más probable que ocurra el remodelado positivo cuando las lesiones coronarias están rodeadas o próximas a la grasa epicárdica, la cual permite mejor la expansión de la arteria [Ward, Jeremias, *et al.* 2001]. La distribución local de la grasa separando la arteria coronaria del miocardio subyacente podría también influir si hay un remodelado positivo sobre la parte de la arteria en contacto con el ventrículo [Prati, Arbustini, *et al.* 2003].

Los ganglios y plexos nerviosos que forman el sistema nervioso cardíaco se encuentran concentrados en cinco regiones auriculares y seis ventriculares [Arora, Waldmann, *et al.* 2003]. El tejido adiposo epicárdico podría servir como lugar anatómico de estos ganglios, proporcionándoles protección frente al daño mecánico. Los estímulos como una oclusión transitoria de una arteria coronaria pueden modificar la actividad generada por las neuronas cardíacas provocando interacciones neuronales a nivel periférico o central. Estas neuronas podrían también mediar el dolor provocado por la isquemia miocárdica. [Rabkin 2007], pero no parece probable que el tejido

adiposo epicárdico juegue un papel en la modulación de la contractilidad miocárdica en el corazón normal.

### ***Fisiopatología del tejido adiposo epicárdico***

El tejido adiposo epicárdico presenta una fuerte correlación con los factores de riesgo asociados a la enfermedad coronaria, especialmente con la obesidad visceral y la circunferencia de cintura, además de tener correlación con los componentes de síndrome metabólico [Iacobellis, Assael, *et al.* 2003, Wheeler, Shi, *et al.* 2005]. Así, existe correlación con el IMC, la glucemia en ayunas y la *diabetes mellitus* tipo II (independientemente del peso de los individuos), siendo en éstos pacientes todavía más pronunciada la diferencia entre hombres y mujeres en cuanto al volumen del tejido adiposo epicárdico [Iozzo, Lautamaki, *et al.* 2009].

#### ***Papel en obesidad e inflamación***

La relación entre el tejido adiposo epicárdico y la obesidad fue observada en la década de los 30 por Smith & Willius. Así, tras realizar la autopsia a 136 pacientes observaron que en la mayoría de los casos existía esta relación, aunque estas observaciones se basaban solamente en el peso del corazón y no en una disección de la grasa que lo recubría [Rabkin 2007]. En la actualidad, se ha comprobado que a medida que aumenta el IMC, el tejido adiposo epicárdico se extiende por toda la superficie anterior del corazón, hasta que acaba por colonizar la región entre el ápex y la base del ventrículo izquierdo. En pacientes con un IMC alto ( $>27\text{kg/m}^2$ ), el volumen de tejido adiposo epicárdico llega a duplicar su volumen cuando se lo compara con individuos no obesos ( $155\pm 15\text{cm}^3$  frente a  $67\pm 12\text{cm}^3$ ) [Gorter, de Vos, *et al.* 2008].

Pese a que no se ha encontrado relación entre obesidad y la inflamación en el tejido adiposo epicárdico, este tejido presenta un patrón de expresión patogénico de adipoquinas inflamatorias [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Baker, Silva, *et al.* 2006]. Así, la expresión de MCP-1, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 y su receptor soluble están elevados en tejido adiposo epicárdico comparado con subcutáneo, lo cual se correlaciona con la presencia de infiltrado de células inflamatorias [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Baker, Silva, *et al.* 2006].

Se han propuesto varios mecanismos para la producción de adipoquinas inflamatorias, como por ejemplo que la liberación de éstas en el tejido adiposo epicárdico puede contribuir a la inflamación a nivel vascular. La producción de especies

reactivas del oxígeno inducidas por esta interacción o derivadas del miocardio podrían también contribuir a un aumento de la inflamación general a nivel local [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005].

#### *Papel en la cardiopatía isquémica*

Aunque a simple vista podría parecer una curiosidad anatómica hay evidencias de la importancia fisiológica y metabólica del tejido adiposo epicárdico, especialmente en la asociación con el riesgo cardiovascular y la patogenia de la aterosclerosis coronaria [Chaowalit, Somers, *et al.* 2006, Chaowalit y Lopez-Jimenez 2008, Lopez-Jimenez y Cortes-Bergoderi 2011]. Pese a que existen estudios longitudinales que apoyan esta teoría [Ding, Hsu, *et al.* 2009, Cheng, Dey, *et al.* 2010], la mayoría son estudios transversales en los cuales no se puede determinar si el volumen del tejido graso es el causante de esta estenosis. Podría argumentarse que la aterosclerosis fuese la causante de la acumulación de tejido adiposo epicárdico, debido a cambios postisquémicos y a la inflamación local que ocurre en la pared vascular [Verhagen y Visseren 2011]. Por el contrario, un estudio de Chaowalit y colaboradores en 2006, no ha encontrado una relación entre el grosor del tejido adiposo epicárdico medido por ecocardiografía y la estenosis arterial en las coronarias [Chaowalit, Somers, *et al.* 2006]. La explicación a esta discrepancia podría encontrarse en que se han utilizado pacientes obesos para el estudio, factor que influye en el volumen del tejido adiposo epicárdico, como se ha comentado anteriormente [Taguchi, Takasu, *et al.* 2001, Gorter, de Vos, *et al.* 2008]. La relación entre tejido adiposo epicárdico y enfermedad coronaria fue encontrada sólo en los individuos con IMC menores de 27 o 25kg/m<sup>2</sup> [Verhagen y Visseren 2011].

Estudios en cadáveres han demostrado que el peso de la grasa subepicárdica se relaciona con el peso total del corazón, y la placa aterosclerótica de las coronarias tiende a ser más prominente en el lado de las arterias en contacto con los depósitos de grasa. Un estudio de Lee & Wu, en el año 1972, puso de manifiesto que ciertos segmentos de arterias coronarias no presentaban aterosclerosis en las regiones donde no aparecía tejido adiposo rodeándolas [Lee y Wu 1972].

Chaowalit y colaboradores demostraron que el grosor del septo inter-auricular, que se relaciona con la cantidad de grasa subepicárdica, se correlaciona con la presencia y la gravedad angiográfica de la enfermedad coronaria [Chaowalit, Somers, *et al.* 2007]. La medida de la grasa subepicárdica en el ventrículo derecho o la cantidad alrededor del

corazón también se relacionan con la circunferencia abdominal, la presión arterial diastólica, la masa del ventrículo izquierdo, la concentración elevada de insulina, la captación de glucosa y la gravedad de la enfermedad coronaria evaluada por angiografía coronaria [Taguchi, Takasu, *et al.* 2001, Iacobellis, Assael, *et al.* 2003].

También ha sido investigada la posible existencia de una conexión entre el tejido adiposo epicárdico y las etapas tempranas de la aterosclerosis o la vulnerabilidad de las placas. Así, se ha demostrado una asociación entre tejido adiposo epicárdico y lesiones no estenóticas o placas no calcificadas, independientemente de la circunferencia de cintura; siendo el volumen de grasa un determinante de la presencia de oclusiones totales y la rotura de placas inestables [Ueno, Anzai, *et al.* 2009, Konishi, Sugiyama, *et al.* 2010]. Las partes de la placa que no están calcificadas están más predispuestas a provocar ruptura, por lo cual el volumen de tejido adiposo también está asociado de forma indirecta con este parámetro, siendo relevante en el desarrollo de síndromes coronarios agudos, aunque esta asociación no ha sido encontrada en algunos estudios [Verhagen y Visseren 2011].

De Vos y colaboradores examinaron la localización particular de la grasas subepicárdica en mujeres postmenopáusicas con tomografía computerizada, y mostraron la relación entre la grasa subepicárdica que rodea directamente las arterias coronarias y diversos factores de riesgo vascular y la falta de relación entre grasa subepicárdica y el IMC. Los autores también encontraron que la grasa pericoronaria está relacionada con la calcificación de las coronarias [de Vos, Prokop, *et al.* 2008].

Es muy posible que los mediadores inflamatorios fuera de la arteria coronaria, como la inflamación subepicárdica y adventicia, contribuyan a las lesiones ateroscleróticas. La cercana relación entre la grasa subepicárdica y las arterias coronarias adyacentes, ya comentada, permite la interacción paracrina entre dichas estructuras [Chaowalit, Somers, *et al.* 2006]. A pesar de que diversos estudios indican una potencial función de la grasa subepicárdica en el desarrollo de la enfermedad coronaria, el mecanismo exacto requiere más estudios.

La asociación del tejido adiposo epicárdico y la aterosclerosis coronaria ha sido estudiada tanto en pacientes con la enfermedad o sospechosos de tenerla, así como en pacientes libres de evidencias médicas de tener enfermedad coronaria. En todos los grupos estudiados ha aparecido una relación, incluso en diferentes grupos raciales. [Verhagen y Visseren 2011].

Pero los resultados deben de ser interpretados con cuidado porque puede haber una influencia del tejido adiposo visceral en cuanto a que es un gran productor de mediadores inflamatorios que podrían actuar a nivel sistémico. Las citoquinas y adipocinas pro-inflamatorias podrían difundir a la pared de los vasos desempeñando su papel fisiológico o fisiopatológico, pudiendo entrar incluso a la circulación coronaria. [Pou, Massaro, *et al.* 2007]. El tejido adiposo epicárdico presenta el mismo origen embrionario que el tejido adiposo omental y mesentérico, con lo cual su capacidad de producir adipocinas es similar a la del tejido adiposo visceral. Ambas secreciones se han comparado en el año 2006 por Baker y colaboradores encontrando diferencias en cuanto a la expresión de PAI-1, IL-6 (aumentadas) y adiponectina (disminuida), sin encontrar cambios en otras como TNF $\alpha$ , leptina o resistina [Baker, Silva, *et al.* 2006]. En un estudio de secreción más reciente, las concentraciones de TNF $\alpha$ , IL-6, leptina y visfatina eran más altas en el medio de cultivo, mientras que las concentraciones de adiponectina en plasma estaban disminuidas [Cheng, Chu, *et al.* 2008], lo cual se correlacionaba con lo encontrado años antes por Iacobellis en cuanto a expresión proteica [Iacobellis, Pistilli, *et al.* 2005].

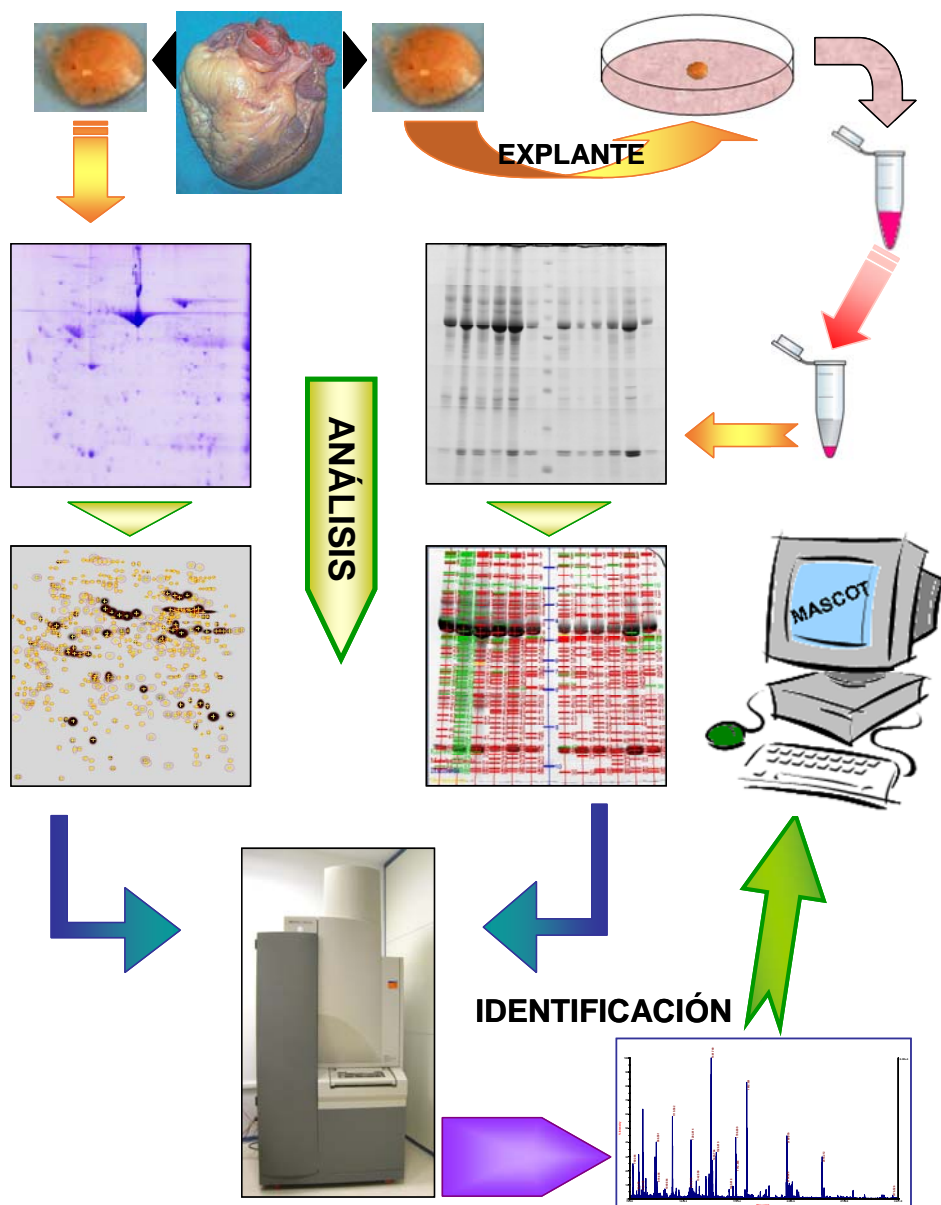
Spiroglou y colaboradores, en estudios *post mortem*, determinaron que probablemente el tejido perivascular es metabólicamente más activo que el epicárdico total, ya que uno correlaciona con la aterosclerosis coronaria mientras que el otro no. La expresión génica de adiponectina, visfatina y quemerina se asociaban con la enfermedad coronaria [Spiroglou, C, *et al.* 2010]. Además, la expresión de adiponectina en tejido adiposo epicárdico se encuentra inversamente relacionada con la extensión de la enfermedad coronaria (entendida ésta como arterias afectadas), mientras que la expresión de IL-6 se relaciona de manera directa en medidas de plasma [Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008].

### **Importancia de los estudios proteómicos y secretómicos**

La genómica ha sido la técnica más utilizada durante la historia científica para identificar cambios de expresión, entre distintos tejidos o estados celulares. Al ser el campo más estudiado, hasta el momento, es también el más desarrollado tecnológicamente. El primer método de estudio amplio del genoma para el análisis de expresión de genes fue la hibridación, a gran escala, de secuencias complementarias

inmovilizadas en un chip con ARNm, los microarrays. Pero a pesar de su tremenda utilidad, los microarrays tienen ciertas limitaciones.

Por este motivo, hoy en día existen otras -ómicas que centran su estudio en diferentes moléculas o aspectos distintos de la genética; como son la transcriptómica (estudio del ARN), la proteómica (estudio de proteínas), la secretómica (estudio de la



**Figura 5.** Flujo de trabajo realizado en esta tesis doctoral para los experimentos de proteómica y secretómica.



secreción), etc. (Figura 5). La madurez técnica de cada una de estas -ómicas está inversamente correlacionada con la complejidad de lo que se intenta estudiar y cada parte de lo que se quiere estudiar presenta ventajas potenciales sobre la anterior.

### ***Proteómica***

Las proteínas son los principales efectores de las funciones biológicas. La importancia de medir proteínas ha crecido por el hecho de que la cantidad de ARNm no siempre se correlaciona con la cantidad de proteína derivada de ese transcrito. Esto se debe a que existen procesos de regulación postraduccional y de regulación de la degradación que no se pueden medir con microarrays de ARNm.

Dentro de la regulación postraduccional cabe destacar la presencia de modificaciones, de entre las cuales algunas son importantes en el desarrollo de enfermedades. Estas modificaciones postraduccionales también son importantes en la regulación de las actividades enzimáticas. De hecho, una de las más comunes es la fosforilación de residuos de serina o tirosina, las cuales están implicadas en la activación de la inmensa mayoría de las rutas de señalización, como por ejemplo la ruta de la insulina [Pirola, Johnston, *et al.* 2004].

El principal inconveniente en el estudio proteómico es que, a diferencia de los oligonucleótidos, las proteínas o los péptidos no se pueden amplificar con lo que la sensibilidad en la visualización o la detección son claves en el desarrollo de las tecnologías proteómicas.

Recientes progresos en la tecnología de proteínas han permitido a los investigadores el estudio de la expresión a nivel proteico e incluso la determinación de las modificaciones postraduccionales. Hasta no hace muchas décadas, la proteómica se basaba en el estudio de las proteínas mediante la utilización de anticuerpos específicos frente a una proteína, una modificación o una proteína modificada en concreto. Este proceso se llevaba a cabo con la ayuda de una separación previa de la muestra (como en el caso del western blot) o bien directamente sobre la mezcla proteica (como en los ensayos de ELISA). Las ventajas que presenta la técnica de ELISA son que además de ser cuantitativa (frente al western blot que es semi-cuantitativo) es capaz de analizar mayor número de muestras en un mismo experimento y con mayor rapidez.

A partir de los años 70 una prometedora técnica se convirtió en la gran arma proteómica, la electroforesis bi-dimensional [O'Farrell 1975]. Desgraciadamente, no ha

sido tan infalible como se esperaba para el estudio de todo el proteoma. La electroforesis bi-dimensional consiste en una doble separación de proteínas, primero por su punto isoelectrico y posteriormente por tamaño. Algunas de las modificaciones postraduccionales provocan cambios en la movilidad electroforética cambiando el punto isoelectrico (por ejemplo fosforilaciones y oxidaciones) o cambiando el tamaño molecular (como las glicaciones y alquilaciones) o ambos, lo cual provoca modificaciones en los patrones de manchas que se pueden visualizar fácilmente en un gel bi-dimensional. Pese a que no ha cumplido todas las expectativas, la posibilidad de poder aislar las proteínas modificadas de las que se presentan en estado nativo y la posibilidad de realizar replicados biológicos precisos, hacen de la electroforesis bi-dimensional el principal caballo de batalla de la proteómica en la actualidad.

La eficacia de la electroforesis bi-dimensional también está supeditada a la técnica de visualización que se utilice. Así, como en cualquier otra técnica hay un incremento de sensibilidad según si la visualización se realiza con cromógenos, fluoróforos o componentes radiactivos. El método más utilizado para la visualización de geles es el de tinción con azul de Coomassie [Neuhoff, Arold, *et al.* 1988], aunque generalmente ha sido considerado un método de visualización poco sensible. Un gran aumento en la sensibilidad se produce con el método basado en nitrato de plata aunque esta tinción presenta baja linealidad [Smejkal, Robinson, *et al.* 2004]. Para salvar estas deficiencias se suelen usar métodos de tinción fluorescentes, como el Sypro Ruby, el Deep Purple o el DIGE. La aproximación DIGE resulta interesante ya que utiliza mezclas de varias muestras marcadas con distintos fluoróforos para su visualización normalizados con el mismo control interno, que consta de una mezcla de todas las muestras usadas en el análisis [Unlu, Morgan, *et al.* 1997], permitiendo detecciones de cambios de incluso un 10% de manera fiable. La selección de una u otra técnica de tinción no sólo debe tener en cuenta la sensibilidad, sino que además debe presentar una buena compatibilidad con el método de identificación de proteínas que se utilice a continuación.

Hasta la fecha, numerosos estudios de proteómica se han realizado para comprobar los posibles cambios a nivel de proteínas durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 [Atiar Rahman, Kumar, *et al.* 2008], desde la primera aproximación bi-dimensional realizada a finales de los '70 [Sidhu 1979], donde pese a encontrar diferencias no se habían podido identificar las proteínas correspondientes a las

manchas observadas en ese momento. También se han realizado estudios proteómicos en tejido adiposo procedente de modelos animales [Lanne, Potthast, *et al.* 2001]. En humanos también se han estudiado los proteomas de tejido adiposo en el contexto de distintas patologías [Corton, Botella-Carretero, *et al.* 2008], realizando comparaciones de tejido total frente a células adipocitarias aisladas [Bouwman, Claessens, *et al.* 2009] o realizando comparaciones entre distintas localizaciones, como por ejemplo omental frente a subcutáneo [Perez-Perez, Ortega-Delgado, *et al.* 2009].

### **Secretómica**

Se define al secretoma como el conjunto de proteínas liberadas por una célula, tejido u organismo a través de cualquier mecanismo de secreción, ya sean mecanismos clásicos o no. El mecanismo clásico sería la ruta de secreción convencional, en la cual las proteínas se traducen a partir del ARNm asociadas al retículo endoplásmico, son transportadas a través del aparato de Golgi y son liberadas por exocitosis.

Las proteínas secretadas por la vía convencional presentan en su secuencia un péptido señal que dirige del ribosoma a la membrana del retículo endoplásmico y que no aparece en la proteína madura, pues es cortado. Este hecho ha provocado la aparición de herramientas bioinformáticas mediante las cuales se puede predecir si una proteína presenta alguna señal de secreción [Skalnikova, Motlik, *et al.* 2011]. Sin embargo, varios reguladores clave de la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación celular, así como de la angiogénesis son secretados sin que contengan un péptido señal, mediante la denominada ruta no convencional de secreción [Prudovsky, Tarantini, *et al.* 2008]. En cuanto a esta ruta, pese a no estar todavía bien caracterizada, se conoce que caspasa-1 tiene un papel importante en la secreción de algunas proteínas [Keller, Ruegg, *et al.* 2008].

El análisis de las proteínas secretadas ha sido un área de investigación atrayente durante los últimos años, sobre todo en el ámbito del cáncer, y lo seguirá siendo en el futuro. Las proteínas secretadas son responsables de la comunicación entre células y si fuese posible comprender el lenguaje mediante el cual las células se comunican, se podría avanzar en el conocimiento de mecanismos moleculares que den lugar a procesos como la neoplasia, la metástasis o la aterosclerosis.

La potencialidad de encontrar proteínas que sirvan como biomarcadores de enfermedades es muy alta. La comparación entre líneas celulares “sanas y enfermas”,

puede revelar diferencias en el patrón de determinadas proteínas con mayor capacidad de secreción al exterior. De esta forma tendrían más facilidad para alcanzar el torrente sanguíneo. Las proteínas secretadas cambiantes se convertirían así en excelentes marcadores serológicos o posibles dianas terapéuticas de una determinada enfermedad.

Pero las líneas celulares no dejan de ser modelos y, pese al avance de las técnicas proteómicas, todavía quedan algunos escollos que salvar en el estudio de los secretomas. Así, existen limitaciones en muestras complejas como son los tejidos y el estudio *in vivo* en animales o humanos, que dificultan el análisis.

En el ámbito del tejido adiposo (dejando a un lado los estudios realizados con ELISA o western blot) se han realizado diferentes estudios sobre la secreción bien de líneas celulares, principalmente la línea de ratón 3T3-L1, bien en tejido de modelos animales o explantes de tejido adiposo humano. Los estudios con los preadipocitos 3T3-L1 se centraron en la observación de los cambios durante la diferenciación [Kratchmarova, Kalume, *et al.* 2002, Wang, Mariman, *et al.* 2004]. También se ha estudiado el secretoma durante la diferenciación de cultivos primarios de tejido adiposo subcutáneo humano [Zvonic, Lefevre, *et al.* 2007, Zhong, Krawczyk, *et al.* 2010]. En cuanto a la secreción del tejido adiposo, se han realizado estudios en modelos animales comparando tejido adiposo visceral y subcutáneo [Hocking, Wu, *et al.* 2010] y en tejido adiposo visceral humano [Alvarez-Llamas, Szalowska, *et al.* 2007].

### ***Espectrometría de masas***

En el centro de cualquier aproximación proteómica se encuentra la espectrometría de masas, sobre todo desde el momento en que se desarrollaron las técnicas de electro-spray y MALDI, que permitían la utilización de moléculas biológicas para espectrometría de masas. Estos hallazgos merecieron el Premio Nobel de Química en el año 2002. A partir de entonces, una serie de avances permitieron tanto la resolución de muestras biológicas complejas como la detección de modificaciones postraduccionales (como las fosforilaciones) e interacciones proteicas [Cox y Mann 2007].

Las proteínas de interés son habitualmente digeridas con tripsina, para generar pequeños péptidos, aunque también se pueden utilizar otros enzimas o compuestos como la quimotripsina o el bromuro de cianógeno. Las digestiones enzimáticas que se utilizan para esta técnica provocan proteólisis específica, ya que cada enzima corta a

una proteína detrás de uno o varios aminoácidos concretos o cuando se da una combinación de dos aminoácidos. Enzimas que hidrolicen de manera inespecífica no son interesantes, porque no permiten predecir los péptidos que se van a formar a partir de una proteína. Así, la tripsina corta tras lisina o arginina, la quimotripsina corta tras cuatro aminoácidos (fenilalanina, metionina, tirosina o triptófano) y el bromuro de cianógeno corta tras metionina.

Las mezclas de péptidos son luego llevadas a un espectrómetro de masas que es el encargado de analizar la mezcla peptídica. Aquí aparecen diferencias, ya que puede haber un paso previo a la introducción de la muestra en el aparato que aumenta su especificidad. Así, se puede encontrar un nano-HPLC acoplado al espectrómetro, que realiza una separación mediante cromatografía líquida en una columna de fase reversa previa a la medición.

A partir de ahí, cualquier espectrómetro de masas consiste de tres partes, una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. Dependiendo de la fuente de ionización encontramos la ionización por electro-spray, el MALDI (desorción e ionización por láser asistida por matriz) y el SELDI (desorción e ionización por láser realizada por superficie).

Como analizadores de masas encontramos el TOF (tiempo de vuelo), el QTOF (tiempo de vuelo a través de cuadrupolo), el LTQ FTs (trampa linear de iones combinada con resonancia de iones en ciclotrón transformado de Fourier) y el LTQ Orbitrap (trampa linear de iones combinada con orbitrap).

A pesar de los avances técnicos, los progresos en cuanto a la cuantificación de proteínas han llevado un paso lento. Dado que la espectrometría de masas no es cuantitativa de por sí, las muestras deben de ser marcadas químicamente con versiones ligera y pesada de un mismo isótopo, como sucede en el caso del ICAT (marcaje de afinidad codificado por isótopos), el iTRAQ (marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa) o el SILAC (marcaje de aminoácidos con isótopos estables para cultivo celular). A mayores de las técnicas para la cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas citadas aquí, hay otras aproximaciones que han sido revisadas por Ong y Mann en el año 2005 [Ong y Mann 2005].



# CAPÍTULO DOS

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## **CAPÍTULO DOS: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Debido a las diferencias que existen entre los tejidos adiposos según su ubicación y a la interacción entre el tejido adiposo con otros tejidos (ya sea de manera paracrina o endocrina), se intentará demostrar la veracidad de las siguientes **hipótesis**:

- ✓ Existe una diferencia entre los tejidos adiposos, epicárdico y subcutáneo, a nivel de contenido y secreción proteicos.
- ✓ La presencia de cardiopatía isquémica en los sujetos de estudio determina cambios en cuanto a los niveles de proteína.

De este modo, los **objetivos** que se han planteado son los siguientes:

- ⊕ Analizar las diferencias de expresión proteica existentes entre tejido adiposo epicárdico y tejido adiposo subcutáneo de pacientes sometidos a cirugía cardíaca.
- ⊕ Comparar la secreción del tejido adiposo dependiendo de su localización.
- ⊕ Determinar los niveles de expresión y secreción proteica en pacientes afectados por cardiopatía isquémica frente a pacientes sin coronariopatía.



# CAPÍTULO TRES

## METODOLOGÍA Y RESULTADOS I

“El análisis proteómico de tejido adiposo epicárdico y subcutáneo revela diferencias en proteínas implicadas en estrés oxidativo”

*“Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress”*



## CAPÍTULO TRES: METODOLOGÍA Y RESULTADOS I

### Introducción al capítulo tres

La obesidad es una de las principales causas de las enfermedades metabólicas que está asociada con una respuesta inflamatoria crónica y con las enfermedades cardiovasculares [Van Gaal, Mertens, *et al.* 2006]. Sin embargo, el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular depende significativamente de la distribución del tejido adiposo en el cuerpo. Por ejemplo, los factores de riesgo metabólicos están más asociados con el tejido adiposo omental (TAO) que con el tejido adiposo subcutáneo (TAS) entre los 3001 participantes en el Estudio Framingham Heart [Fox, Massaro, *et al.* 2007]. De manera plausible, estas diferencias son debidas a los diferentes tejidos adiposos, ya que difieren en la expresión de adipoquinas y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) inflamatorias; y este tipo de moléculas están asociadas con la enfermedad cardiovascular [Griendling y FitzGerald 2003]. De este modo, el TAO está asociado con más sustancias circulantes relacionadas con inflamación y estrés oxidativo de lo que lo está el TAS [Pou, Massaro, *et al.* 2007].

El tejido adiposo epicárdico (TAE) está considerado como un depósito de grasa visceral adyacente a las arterias coronarias y el miocardio [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005]. La cantidad de TAE está relacionada con la masa del ventrículo izquierdo [Iacobellis, Ribaud, *et al.* 2004] y con la cantidad de grasa visceral intra-abdominal. De hecho, la adiposidad visceral puede ser evaluada por medio de la medida ecocardiográfica del TAE [Iacobellis, Assael, *et al.* 2003]. Al igual que otros tejidos adiposos, el tejido adiposo epicárdico es reconocido hoy en día como un órgano endocrino y su proximidad al miocardio y a las arterias coronarias sugiere la posibilidad de una acción paracrina sobre estas estructuras. De hecho, en pacientes con enfermedad coronaria (CI) [Iacobellis 2005, Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008] e hipertensión [Teijeira-Fernandez, Eiras, *et al.* 2008], el TAE produce niveles menores de adiponectina (adipoquina anti-inflamatoria) y niveles más altos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y leptina de los que produce en pacientes sin enfermedad coronaria o no hipertensos que se han sometido a cirugía cardíaca. Los niveles de adiponectina en TAS no cambian entre pacientes con/sin hipertensión [Teijeira-Fernandez, Eiras, *et al.* 2008], y las citoquinas pro-inflamatorias de pacientes con enfermedad coronaria están más elevadas en TAE que en TAS [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003].

En mujeres con síndrome de ovario poliquístico que presentan obesidad mórbida, se ha realizado un análisis proteómico del TAO por medio de electroforesis bi-dimensional (2DE) y espectrometría de masas (MS). Mediante este estudio se han identificado alteraciones en los niveles de proteínas implicadas en el metabolismo de glúcidos y lípidos, estrés oxidativo y diferenciación adipocitaria [Corton, Botella-Carretero, *et al.* 2008]. También han sido publicadas las diferencias proteómicas entre el TAO y el TAS [Perez-Perez, Ortega-Delgado, *et al.* 2009]. Sin embargo, no se han hecho estudios proteómicos hasta el momento comparando TAS y TAE en pacientes con enfermedad cardiovascular.

Así, en este capítulo se plantea que las adipoquinas producidas localmente por el TAE podrían estar reflejando o afectando a la fisiología y patología cardiovascular debido a su proximidad, sin barreras anatómicas, a las arterias coronarias y al miocardio. De esta manera, se han estudiado los patrones de expresión proteica de TAE y TAS para identificar moléculas locales candidatas que caractericen al TAE de pacientes con enfermedad cardiovascular. En vista de los antecedentes mencionados anteriormente, se ha prestado especial atención a proteínas relacionadas con el estrés oxidativo.

**Metodología I****Pacientes**

Se han estudiado un total de 55 pacientes que se sometieron a cirugía cardíaca (reemplazo valvular o revascularización coronaria). Las medias $\pm$ desviación estándar para la edad y el IMC fueron  $71\pm 9$  años y  $28\pm 4$  kg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Los pacientes no se habían sometido previamente a cirugía cardíaca ni sufrían enfermedades infecciosas graves. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia y llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. En la Tabla 1 se resumen las características clínicas de los pacientes cuyo material fue usado en los diversos experimentos que se describen a continuación.

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes utilizados en el capítulo tres. Número de pacientes (n); reacción en cadena de la polimerasa (PCR); azul nitro-tetrazolio cloruro (NBT).

	Sexo (♂)		Hipertensión		Diabetes		Cardiopatía isquémica		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Análisis proteómico	6	54,5	9	81,8	2	18,2	6	54,5	11
PCR en tiempo real	14	58,3	21	87,5	7	29,2	12	50,0	24
Western blot	15	62,5	19	79,2	6	25,0	14	58,3	24
Ensayo NBT	5	50,0	7	70,0	3	30,0	5	50,0	10
Total	28	50,9	37	67,3	12	21,8	24	43,6	55

**Material Biológico**

El TAE (~0,2-0,5g de peso seco) fue obtenido de la parte superior del ventrículo derecho y el TAS (~2g de peso seco) fue obtenido del tórax. Las muestras fueron colocadas en 5mL de solución salina fisiológica (PSS) que contiene EDTA 0,5mM, KCl 5mM, HEPES 10mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5mM, glucosa 10mM, NaCl 110mM y CaCl<sub>2</sub> 0,16mM (pH 7,4). Luego fueron centrifugadas a 300g durante 15' para eliminar la sangre antes de ser congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

**Extracción de Proteína**

Las muestras de tejido adiposo fueron cortadas en pedazos de 100-150mg, lavadas con 5mL de PSS, centrifugadas a 300g durante 1' para eliminar la sangre

remanente y lisadas en 300µL de tampón de lisis [Tris (pH 6,8) 125mM, 10% de glicerol, 2% de dodecilsulfato sódico (SDS), *dithiothreitol* (DTT) 100mM] y cóctel de anti-proteasas (Sigma- Aldrich)]. Se disgregaron con una punta de flecha para homogeneizador siguiendo el protocolo del kit Sample Griding (GE Healthcare). Las proteínas fueron precipitadas con el kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante y finalmente se resuspendieron en solución de muestra (urea 7M, thiourea 2M, 4% del detergente CHAPS y DTT 40mM) a una concentración final de 1mg de tejido homogeneizado por cada 1µL de solución

### ***Electroforesis bi-dimensional en gel de poli-acrilamida***

La electroforesis bi-dimensional (2DE) fue llevada a cabo sobre muestras procedentes de 11 pacientes (edad>60años en todos los casos, IMC 20-30kg/m<sup>2</sup>). Las proteínas fueron separadas para la primera dimensión en tiras IPG de 13cm (GE Healthcare; pH 3–10NL) siguiendo el protocolo del fabricante con pequeñas modificaciones. Un volumen de preparación proteica correspondiente a 100mg de tejido homogeneizado fue diluido en solución de rehidratación [añadiéndole a la solución de muestra 0,5% de tampón IPG y 1,2% de solución DeStreak (GE Healthcare)]. Así, las tiras fueron rehidratadas activamente durante 10h a 20°C. Las tiras cargadas fueron corridas a 0,05mA/tira en un Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) usando el siguiente programa de voltaje nominal: 1h a 500V, 2h de 500V a 1000V, 2,5h de 1000V a 8000V, manteniendo a 8000V hasta alcanzar 25000Vh totales. Posteriormente se trataron las tiras durante 15' con tampón de equilibrio [urea 6M, Tris·HCl 75mM (pH 8,8), 29% glycerol, 2% SDS y 0,002% de azul de bromofenol] primero conteniendo un 1% de DTT, seguido de 15' en tampón de equilibrio conteniendo un 0,25% de iodoacetamida, antes de realizar la separación de la segunda dimensión durante 3h en un gel de SDS-poli-acrilamida al 10% en un sistema Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare) a 50mA/gel.

Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie, digitalizados en un escáner GS800 (Bio-Rad) y las imágenes resultantes fueron procesadas y analizadas usando el programa PDQuest 7.0 (Bio-Rad): la sustracción de fondo, cuantificación y normalización con respecto a la densidad óptica (DO) total de la imagen fueron llevadas a cabo de manera automática. Las diferencias entre TAE y TAS fueron expresadas



como coeficiente de incremento, calculado como densidad óptica de la mancha en TAE dividida entre densidad óptica de la mancha en TAS.

### ***Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas***

*Digestión a partir de gel y extracción de péptidos.* Las manchas proteicas elegidas para el análisis de espectrometría de masas fueron cortadas del gel y digeridas según el método de Shevchenko y colaboradores [Shevchenko, Wilm, *et al.* 1996], con pequeñas modificaciones. Los trozos de gel fueron tratados sucesivamente de la siguiente forma: reducción con DTT 10mM en bicarbonato amónico 50mM (Sigma-Aldrich), alquilación con iodoacetamida 55mM (Sigma-Aldrich) en el mismo tampón, lavados con bicarbonato amónico 50mM en 50% de metanol (grado de pureza de HPLC, Scharlau), deshidratados por adición de acetonitrilo (grado de pureza de HPLC, Scharlau), secados en un SpeedVac y digeridos a 37°C durante 16h con tripsina porcina modificada por Promega (20ng/μL en bicarbonato amónico 20mM). Los péptidos fueron extraídos mediante 3 incubaciones de 20' en 40μL de acetonitrilo al 60% en 0,5% de ácido fórmico y los extractos mezclados fueron concentrados en un SpeedVac y almacenados a -20°C.

*Análisis de espectrometría de masas.* Los péptidos secos fueron disueltos en 4μL de 0,5% de ácido fórmico y 0,5μL de esta solución fueron mezclados con un volumen igual de solución matriz que está compuesta por 3mg de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 50% de acetonitrilo conteniendo un 0,1% de ácido trifluoroacético. Esta mezcla se deposita mediante el método de capa fina en una placa para MALDI Opti-TOF de 384 pocillos (Applied Biosystems). Los datos de la espectrometría de masas se obtienen en un bucle de análisis automático con un analizador Applied Biosystems 4800 MALDI-TOF/TOF; los datos de MS usando un modo de reflector de iones positivos, un *Nd:YAG laser* ( $\lambda=355\text{nm}$ ), una media de 1000 disparos de láser y al menos 3 picos de auto-lisis de tripsina para la calibración interna; y los datos de MS/MS usando precursores seleccionados con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión de iones como resultado de la disociación de especies meta-estables. Los datos se analizan con el programa informático 4000 Series Explorer Software V3.5. Los datos obtenidos mediante MS y MS/MS son volcados a Mascot v2.1 (Matrix Science) vía GPS Explorer v3.6 (Applied Biosystems) para buscar una base de datos no redundante (SwissProt release 56.0) con una tolerancia de precursor de 30ppm, una

tolerancia de fragmento de MS/MS de 0,35Da y permitiendo una ausencia de corte. Todos los espectros y resultados de la base de datos fueron inspeccionados en detalle con el programa citado anteriormente.

#### ***Extracción de ARNm y RT-PCR en tiempo real***

Usando el kit de extracción Oligotex Direct mRNA (Qiagen GmbH), se aisló el ARNm de ~100mg de muestras pareadas de TAE y TAS procedentes de 24 pacientes (edad:  $70 \pm 10$  años, IMC:  $28 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ ); la concentración final de cada muestra correspondió a 1mg de tejido por cada 1μL de solución. La solución de ARNm (4,14μL) fue transcrita usando 200U de la transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen) en 30μL de una solución a pH=8,4 que contiene Tris-HCl 20mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, dNTPs 2,5mM, 20U de inhibidor de ribonucleasas y cebadores aleatorios; seguida de un programa de retrotranscripción a 37°C durante 50', 42°C durante 10' y 95°C durante 5'. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo usando 8μL (4μL por cada duplicado) de ADN complementario, Fast Start SybrGreen (Roche Diagnostics) como fluorocromo y cebadores específicos a una concentración de 300nM. Los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación se encuentran en el Anexo 1. Se ha utilizado actina (ACTB) como gen de referencia. Las curvas de fluorescencia fueron analizadas usando el programa Opticon monitor 3.0 para Chromo4 (MJ Research): la expresión relativa de cada gen de interés fue calculado con respecto a la expresión de actina. La validez del producto de amplificación fue comprobada examinando las curvas de disociación. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

#### ***Análisis por western blot***

Los análisis de western blot en una dimensión (1DE) fueron realizados sobre muestras pareadas de TAE y TAS procedentes de 24 pacientes (edad  $72 \pm 8$  años e IMC  $28 \pm 4 \text{ kg/m}^2$ ), y los análisis en dos dimensiones (2DE) sobre muestras de 3 de estos pacientes. En el caso del 1D, 6μL de proteína preparada como se describió anteriormente, se separó en un gel de SDS-PAGE al 10% y fue transferida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 280mA durante 45'. La 2DE se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente y las manchas de proteínas resultantes fueron transferidas sobre una membrana de PVDF durante 45' a 600mA.

Las membranas de PVDF fueron bloqueadas a temperatura ambiente durante 1h con leche al 5% en TBS-T que contiene Tris·HCl (pH 7,6) 20mM, NaCl 150mM y Tween 20 al 0,1%; expuestas durante 3h a los anticuerpos primarios [catalasa de conejo (CATA; dilución 1:2000; Abcam), GSTP1 de ratón (1:1000), fosfoglicerato mutasa 1 de ratón (PGAM1; 1:1000), ACTB de ratón (1:1000) o PDIA1 (1:750); todos de Santa Cruz Biotechnology] y tratadas con Inmunoglobulinas G de cabra conjugadas con peroxidada anti-conejo/ratón, respectivamente. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas usando un sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL, de Pierce) y en los análisis de 1DE fueron cuantificados densitométricamente usando el programa ImageJ, siendo expresados los niveles de proteína diana relativos al gen de referencia ACTB. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

### ***Inmunohistoquímica***

Las muestras de TAE y TAS fueron fijadas en formalina, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 4µm. Los antígenos de las secciones desparafinadas y rehidratadas fueron desenmascarados con Tris-EDTA 0,25mM (pH 9) en un baño de agua a 99°C durante 20', seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente durante otros 20'. Las secciones fueron incubadas posteriormente con el anticuerpo frente a CATA (dilución 1:100), seguido de LSAB (DakoDiagnostics), usado como anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina-biotina. El antígeno marcado fue visualizado con 3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato (DakoDiagnostics). La tinción con hematoxilina se llevó a cabo usando procedimientos estándar. Los controles negativos fueron procesados sin el anticuerpo primario.

### ***Ensayo de reducción del azul cloruro de nitro-tetrazolio (NBT)***

La producción de ROS de las oxidasas celulares inducida por NADPH en muestras pareadas de TAE y TAS de 10 pacientes fue determinada mediante la reducción del NBT a su correspondiente sal insoluble de diformazán. Las muestras (100mg) fueron lavadas en PSS, homogeneizadas en 300µL de PSS-Ca<sup>+2</sup> (PSS conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0,16mM) y centrifugadas a 13000g durante 10' para eliminar tanto restos de tejido homogeneizado como membranas o lípidos. Un volumen correspondiente a 10mg de tejido homogeneizado fueron diluidos en solución de ensayo (NBT 100µM y NADPH 100µM en PSS) con o sin *diphenylene iodonium* (DPI) 60µM

como inhibidor de la reacción. Las diluciones apropiadas de solvente en el cual se había preparado el DPI (1:1 agua/dimetil sulfóxido) fueron usadas como controles. Se determinó la absorbancia a 550nm cada 5' durante 2h en un lector de microplacas (Multiscan EX de ThermoLabsystems). Se calculó la pendiente de la curva obtenida para cada muestra individual usando Origin 6.0 (Microcal Software).

Para el análisis de las fracciones celulares los tejidos fueron digeridos con 2mL de una solución de colagenasa en PSS (1mg/mL) en un tubo de cristal a 37°C durante 2h. Los adipocitos se terminaron de liberar mediante agitación mecánica usando una aguja y los fragmentos de tejido que permanecieron tras el proceso fueron recogidos y conservados en un tubo de polipropileno. La suspensión de células fue centrifugada a 300g durante 10' y la fase acuosa fue eliminada por aspiración y recogida en tubos de polipropileno. Los adipocitos fueron lavados con PSS templado (37°C) y centrifugados a 300g durante 5'. El PSS fue eliminado por aspiración y recogido de nuevo en los tubos de polipropileno. La fracción estromal-vascular recogida en los tubos de propileno en los distintos pasos fue centrifugada a 1500g durante 5'. Tras la centrifugación, los sobrenadantes fueron descartados y los precipitados obtenidos se lavaron con PSS y se volvieron a centrifugar a 1500g durante 5' (siendo, de nuevo, descartado el sobrenadante). La homogenización de las fracciones adipocitaria y estromal-vascular se realizó con 150µL de PSS y el ensayo de NBT se ha llevado a cabo como se ha descrito anteriormente.

### ***Inmunoprecipitación***

TAE y TAS (100mg) de tres pacientes fueron lavados en 5mL de PBS (NaCl 136,9mM, KCl 2,68mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,09mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76mM) y centrifugados a 300g durante 1' para eliminar residuos de sangre. Los tejidos fueron resuspendidos en 1mL de PBS y disgregados con una punta de flecha para homogeneizador. Después de eliminar los lípidos por centrifugación, 500µL de proteínas totales fueron incubados con 2µg de anticuerpos anti-tirosina (clon 4G10) o anti-serina (clon 4A4), ambos de ratón (Millipore), a 4°C durante toda la noche. Se utilizaron las bolas magnéticas Pure Proteome Protein A/G (Millipore) según el protocolo del fabricante indicado para el aislamiento de complejos antígeno-anticuerpo usando un soporte magnético. Los complejos formados por las bolas magnéticas y los complejos antígeno-anticuerpo se separaron mediante desnaturalización a 95°C en 25µL de tampón Laemmli. Las

membranas fueron posteriormente incubadas con anticuerpos de ratón contra GSTP1, PDIA1 y PGAM1 o de conejo contra CATA como se ha descrito previamente para el western blot.

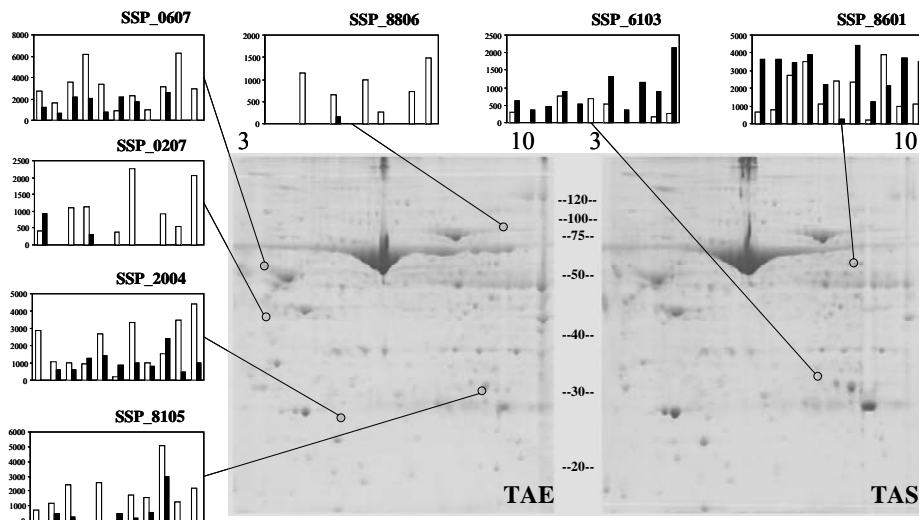
### ***Análisis estadístico***

Todos los resultados están mostrados como media±desviación estándar a no ser que se especifique de otra manera. Las diferencias entre TAE y TAS han sido analizadas con un test *t* de Student para muestras pareadas. Las diferencias entre grupos de pacientes fueron analizadas con un test *t* de Student. La igualdad de las varianzas fue analizada previamente con un test de Levene. La independencia de dos variables categóricas con frecuencias conocidas fue analizada por un test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). La significatividad estadística ha sido definida como  $p < 0,05$ . Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa informático SPSS 15.0 para Windows.

## Resultados I

### 2DE y Espectrometría de Masas

Se ha realizado una comparación entre geles 2DE de TAE y sus correspondientes geles de TAS, mostrando  $270 \pm 43$  y  $250 \pm 26$  manchas proteicas, respectivamente. La Figura 6 muestra geles representativos de TAE y TAS (y la intensidad de la mancha en cada muestra) para cada una de las siete manchas que mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los dos tejidos. Cinco manchas han sido más intensas en el TAE que en el TAS y dos más intensas en el TAS que en el TAE (las diferencias de incremento se pueden ver en la Tabla 2). Excepto para la mancha SSP\_8806, que aparece sólo en 6 pacientes, todas las demás aparecen bien en el TAE o bien en el TAS de al menos 8 pacientes.



**Figura 6.** Diferencias proteómicas entre TAE y TAS en 11 pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Se muestran 2 geles representativos de 2DE (sobre ellos se indica la disposición en cuanto al punto isoeléctrico; entre ellos la escala del marcador de peso molecular), indicando la posición de las manchas que presentan diferencias de intensidad. Las gráficas para cada mancha muestran la densidad óptica normalizada en TAE (barras blancas) y TAS (barras negras), para cada uno de los pacientes. Las identificaciones de las proteínas contenidas en cada mancha se pueden ver en la Tabla 2.

Mediante espectrometría de masas se han identificado 8 proteínas: 2 contenidas en la mancha SSP\_0207 y una en cada una de las demás manchas (Tabla 2). Todas las proteínas identificadas tienen una puntuación de MASCOT superior a 100, pero una de las proteínas atribuidas a la mancha SSP\_0207, la proteína ribosomal SA, ha sido desechada dado que su peso molecular no coincidía con la posición de la mancha en el gel. De las siete restantes, cinco están relacionadas con el estrés oxidativo: anhidrasa

carbónica 1 (CAH1), catalasa (CATA), glutatión S-transferasa P (GSTP1), proteína disulfuro isomerasa (PDIA1) y fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1). Una de las otras dos, vimentina (VIME), es estructural; la otra, aconitasa (ACO2), es un intermediario metabólico. Las dos manchas con niveles más altos en TAS que en TAE fueron CAH1 y CATA.

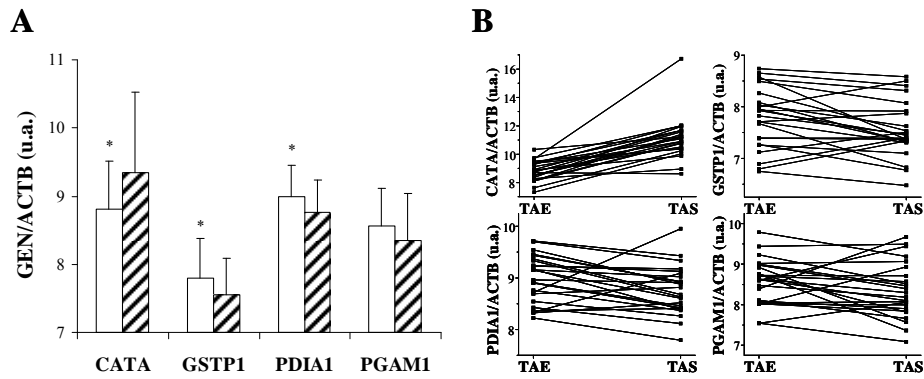
**Tabla 2.** Análisis proteómico e identificación de las proteínas. Peso molecular ( $P_M$ ); punto isoeléctrico (PI); incremento ( $\Delta$ ).

SSP	Nombre	Nombre de acceso	$P_M$ (kDa)	PI	Cobertura secuencia	$\Delta$
0207	Vimentina	VIME_HUMAN	53520,49	5,06	54,84%	+7,051
	Proteína ribosomal SA 40S	RSSA_HUMAN	32722,88	4,79	54,42%	
0607	Protein disulfuro isomerasa	PDIA1_HUMAN	55294,02	4,69	57,23%	+2,565
2004	Glutatión S- transferasa P	GSTP1_HUMAN	23224,64	5,44	66,03%	+2,167
6103	Anhidrasa carbónica 1	CAH1_HUMAN	28739,02	6,63	56,92%	-3,267
8105	Fosfoglicerato mutasa 1	PGAM1_HUMAN	28672,74	6,75	72,73%	+3,887
8601	Catalasa	CATA_HUMAN	59624,98	6,95	65,21%	-1,632
8806	Aconitato hidratasa mitochondrial	ACON_HUMAN	82425,78	6,85	35,33%	+32,177

### ***RT-PCR en Tiempo Real***

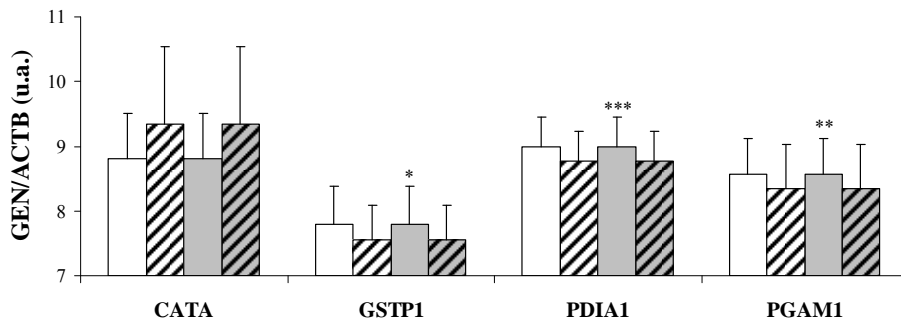
Los experimentos de RT-PCR en tiempo real fueron llevados a cabo para las 4 proteínas relacionadas con estrés que habían sido detectadas en casi todos los pacientes: CATA (gen: CAT), GSTP1, PDIA1 (gen: P4HB), y PGAM1. Con respecto a ACTB, los niveles de CATA fueron menores en TAE que en TAS de manera significativa ( $8,81 \pm 0,7$  frente a  $9,35 \pm 1,2$ , en unidades arbitrarias;  $p=0,022$ ), mientras que los niveles de ARNm de GSTP1 y PDIA1 fueron mayores en TAE que en TAS de manera significativa ( $7,79 \pm 0,6$  frente a  $7,55 \pm 0,5$ , y  $8,99 \pm 0,5$  frente a  $8,76 \pm 0,5$ ;  $p=0,016$  y

$p=0,027$ , respectivamente). La expresión génica de PGAM1 no ha mostrado diferencias significativas ( $8,56\pm0,6$  en TAE y  $8,35\pm0,7$  en TAS;  $p=0,128$ ; ver Figura 7A).



**Figura 7.** Resultados del análisis de RT-PCR de 24 muestras. **A.** El diagrama de barras muestra los niveles de expresión de CATA, GSTP1, PDIA1 y PGAM1 en TAE (barras lisas) y TAS (barras rayadas). Los asteriscos indican una significatividad estadística de  $p<0,05$ . **B.** Niveles de ARNm normalizados con ACTB en TAE y TAS de cada paciente. Unidades arbitrarias (u.a.).

De manera interesante, mientras que los niveles de ARNm de CATA fueron menores en TAE que en TAS en los 24 sujetos estudiados, esto no sucedía así para los otros ARNm (Figura 7B).



**Figura 8.** Las barras representan la expresión de ARNm de los cuatro genes estudiados con respecto a ACTB en unidades arbitrarias (u.a.). Se representan los valores de TAE (barras lisas) y TAS (barras rayadas) para los grupos de pacientes con CI (barras blancas;  $n=12$ ) y NCI (barras grises;  $n=12$ ). El análisis con el test estadístico  $t$  de Student para muestras pareadas muestra diferencias significativas entre TAE y TAS en pacientes con CI (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ).

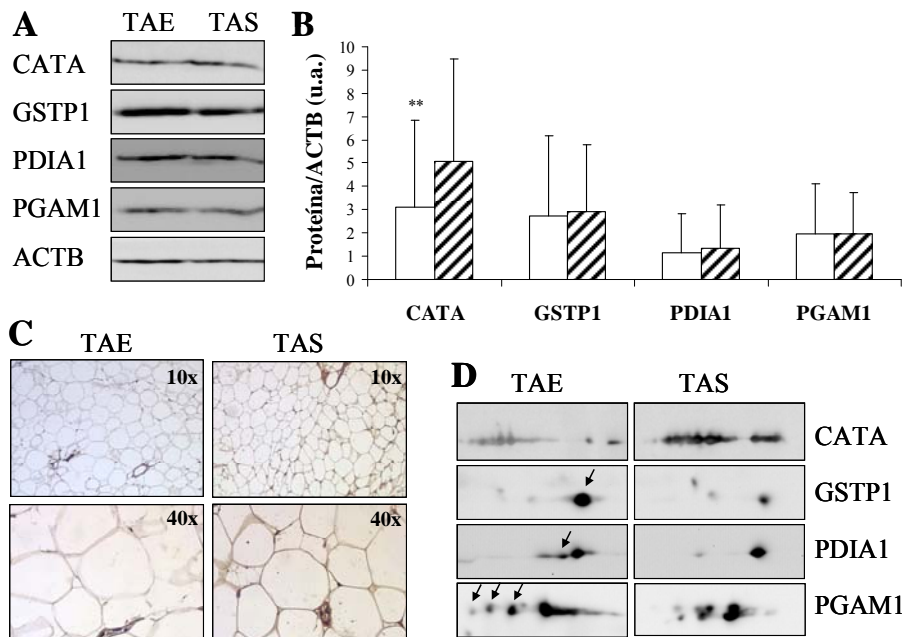
Se evaluaron las diferencias de expresión de CATA, GSTP1, PDIA1 y PGAM1 entre TAE y TAS en el grupo de pacientes con CI ( $n=12$ ), encontrando que los niveles de expresión para GSTP1, PDIA1 y PGAM1 eran más altos en TAE que en TAS ( $7,72\pm0,6$  frente a  $7,40\pm0,6$ ;  $p=0,015$ ,  $9,02\pm0,5$  frente a  $8,60\pm0,4$ ;  $p=0,001$  y  $8,53\pm0,6$



frente a  $8,10 \pm 0,6$ ;  $p=0,002$ , respectivamente). Sin embargo, no había diferencias con respecto a la expresión de CATA ( $8,72 \pm 0,7$  frente a  $9,31 \pm 1,54$ ;  $p=0,135$ ). Tras el análisis de expresión de ARNm en el grupo de pacientes sin CI (NCI;  $n=12$ ), hemos detectado que los niveles de GSTP1, PDIA1 y PGAM1 eran similares entre TAE y TAS. Además, no se han detectado diferencias entre CI y NCI en TAE o en TAS (Figura 8).

#### Análisis de Western Blot e Inmunohistoquímica

Los análisis de western blot fueron llevados a cabo para las mismas proteínas que se habían estudiado mediante RT-PCR en tiempo real. La Figura 9A muestra el resultado de 1DE para un paciente representativo.



**Figura 9.** Resultados de western blot e inmunohistoquímica. **A.** Western blot de un paciente representativo usando anticuerpos frente a CATA, GSTP1, PDIA1, PGAM1 y ACTB en TAE y TAS. **B.** El diagrama de barras representa las densidades ópticas de las proteínas de interés normalizadas con ACTB para muestras de TAE (lisas) y TAS (rayadas) de 24 pacientes.  $**p < 0,05$ . **C.** Inmunohistoquímica en TAE y TAS usando el anticuerpo frente a catalasa. **D.** Western blot sobre geles 2DE representativos en TAE y TAS para las proteínas estudiadas.

Para las proteínas CATA y PGAM1, los resultados cuantitativos del western blot estuvieron de acuerdo de manera cualitativa con los resultados de RT-PCR en tiempo real. Así, los niveles de CATA relativos a ACTB fueron menores en el TAE que en el TAS ( $3,1 \pm 3,7$  frente a  $5,1 \pm 4,4$ ;  $p=0,003$ ) y no aparecían diferencias

estadísticamente significativas para PGAM1 ( $2,1 \pm 1,6$  frente a  $2,2 \pm 1,1$ ;  $p=0,800$ ). También se evaluó el contenido de proteína para CATA entre TAE y TAS de pacientes con y sin CI. Así, los niveles de CATA fueron menores en TAE que en TAS en pacientes NCI ( $2,5 \pm 1,7$  frente a  $6,1 \pm 2,8$ ;  $p=0,012$ ), pero estos cambios no fueron detectados en pacientes con CI ( $3,5 \pm 4,7$  frente a  $4,4 \pm 5,2$ ;  $p=0,103$ ).

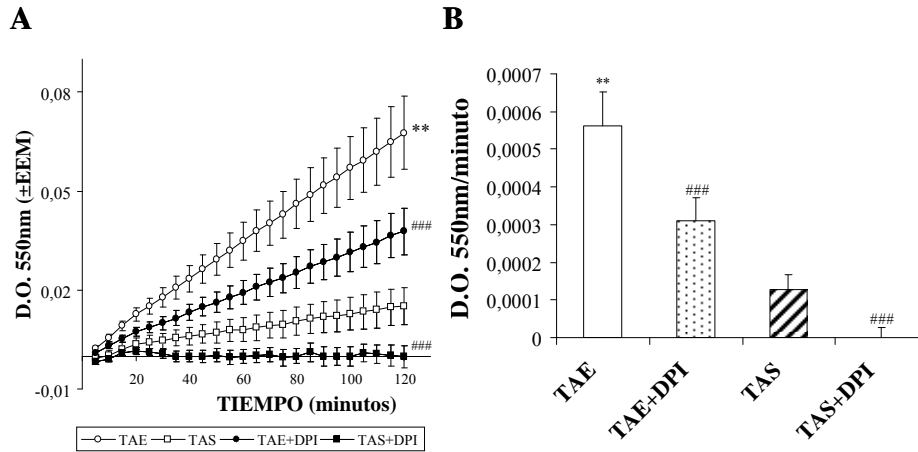
Por el contrario, los resultados de western blot 1DE para GSTP1 y PDIA1 aparentemente diferían de los resultados de RT-PCR en tiempo real, ya que ambos, al igual que ocurría con PGAM1, no mostraban diferencias significativas entre TAE y TAS (GSTP1,  $2,7 \pm 3,4$  frente a  $2,9 \pm 2,8$ ,  $p=0,745$ ; y PDIA1,  $1,4 \pm 1,4$  frente a  $1,8 \pm 1,5$ ,  $p=0,508$ ; Figura 9B). Además, se comprobó (aunque no se muestra gráficamente) que la CI era independiente de los niveles proteicos de GSTP1, PDIA1 y PGAM1.

Los resultados para CATA estuvieron en concordancia con la observación inmunohistoquímica de que los adipocitos del TAE fueron menos reactivos que los del TAS para el anticuerpo de CATA (Figura 9C).

La Figura 9D muestra los western blots 2DE que ilustraban más claramente el comportamiento bi-dimensional. El patrón de manchas de PDIA1 fue diferente en ambos tejidos. Además, existen 3 manchas correspondientes a GSTP1, una de ellas más intensa en TAE que en TAS. Para PGAM1, el TAE muestra 4 manchas frente a las 3 que aparecen en TAS. Estas diferencias en el patrón postraducciona l podrían explicar las aparentes discrepancias entre el análisis proteómico y los resultados de western blot.

### ***Ensayo de estrés oxidativo***

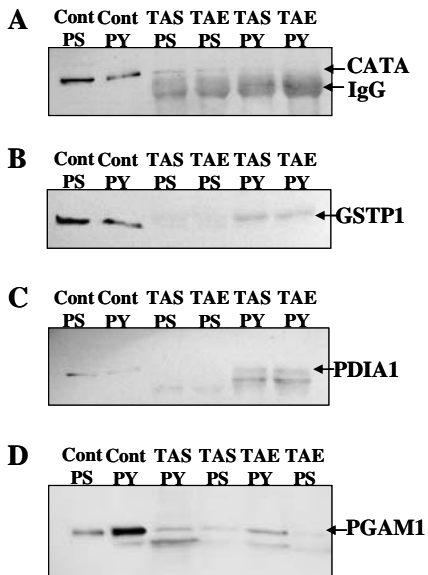
Se ha revelado una mayor producción de especies reactivas del oxígeno inducidas por NADPH en el TAE que en el TAS comparando las curvas de las gráficas, individualmente para cada paciente, de la absorbancia de diformazán frente al tiempo. De este modo, la media de las pendientes fue mayor de manera estadísticamente significativa para el TAE que para el TAS ( $5,61 \times 10^{-4}$  frente a  $1,26 \times 10^{-4}$ /min,  $p=0,0037$ ; Figura 10). La presencia de DPI inhibió la reacción, reduciendo las curvas significativamente ( $p=0,001$ ) en TAE ( $3,12 \times 10^{-4}$ /min) y en TAS ( $1,27 \times 10^{-6}$ /min). El DPI, el DMSO y la mezcla de reacción no influyeron en la absorbancia (datos no mostrados).



**Figura 10.** Ensayo para medir la producción de especies reactivas del oxígeno en TAE y TAS de 10 pacientes. **A.** Medida de la densidad óptica (D.O.) a 550nm durante el transcurso del experimento, con o sin la adición de DPI a la mezcla de reacción. **B.** Diagrama de cajas que representa la media $\pm$ error estándar de las pendientes. Para los datos estadísticos mostrados: \*\* $p < 0.01$  entre TAE y TAS; ### $p < 0.001$  entre con/sin DPI.

### Inmunoprecipitación

Se había observado en el western blot 2DE que GSTP1, PDIA1 y PGAM1 estaban representadas por más de una mancha. Una de las modificaciones postraduccionales más frecuentes en las proteínas es la fosforilación en serina y/o tirosina. De este modo, tras inmunoprecipitación con fosfoserina o fosfotirosina hemos detectado que CATA, GSTP1, PDIA1 y PGAM1 son proteínas que pueden ser fosforiladas al menos en tirosina o serina (Figura 11).



**Figura 11.** Inmunoprecipitación de proteínas con anticuerpos frente a fosfoserina (PS) o fosfotirosina (PY) en muestras de TAE y TAS. Posteriormente, se ha realizado un western blot con anticuerpos frente a CATA (**A**), GSTP1 (**B**), PDIA1 (**C**) y PGAM1 (**D**). Como controles de PS y PY se ha utilizado lisado de células A431 tratadas con ácido ocaído/calculin A o con EGF, respectivamente.

### **Discusión del capítulo tres**

Aunque se habían realizado varios estudios proteómicos con tejido adiposo visceral, omental y subcutáneo [Alvarez-Llamas, Szalowska, *et al.* 2007, Corton, Botella-Carretero, *et al.* 2008, Perez-Perez, Ortega-Delgado, *et al.* 2009], esta es la primera vez que se ha comparado tejido adiposo epicárdico y subcutáneo de pacientes con enfermedad cardiovascular mediante un análisis proteómico. Se han encontrado evidencias de que los niveles de catalasa en pacientes sometidos a cirugía cardíaca son menores en el TAE que en el TAS y que en estos pacientes ambos tejidos difieren en los perfiles postranscripcionales de proteínas implicadas en procesos de estrés oxidativo, como son PDIA1, GSTP1 y PGAM1. Además, el tejido adiposo epicárdico presenta mayor estrés oxidativo que el tejido adiposo subcutáneo en pacientes con enfermedad cardiovascular.

En este estudio, las diferencias en los proteomas de los tejidos adiposos epicárdico y subcutáneo fueron detectadas inicialmente mediante tinción con azul brillante de Coomassie, que es una de las tinciones más usadas para geles de SDS-PAGE [Neuhoff, Arold, *et al.* 1988]. Este método es considerado, generalmente, menos sensible que la tinción de plata o técnicas de tinción fluorescente, pero también es menos susceptible a la variabilidad entre geles que la tinción con plata [Quadroni y James 1999]. Se ha observado que hay un aumento en la sensibilidad cuando se utiliza fluorescencia en el infrarrojo cercano para la detección de la imagen [Luo, Wehr, *et al.* 2006], en cuyo caso el azul de Coomassie es comparable a la tinción con Sypro Ruby [Harris, Churchward, *et al.* 2007].

Catalasa es un enzima anti-oxidante que protege contra los efectos potencialmente dañinos del peróxido de hidrógeno, que es una especie reactiva del oxígeno, ya que lo convierte en oxígeno y agua. Ratones transgénicos que producen catalasa humana en las mitocondrias son más longevos [Furukawa, Fujita, *et al.* 2004, Schriner, Linford, *et al.* 2005], y el tejido adiposo de ratones obesos presenta niveles de catalasa menores mientras que los de peróxido de hidrógeno están elevados [Furukawa, Fujita, *et al.* 2004]. Al igual que otras especies reactivas del oxígeno, el peróxido de hidrógeno desencadena la producción de varios factores inflamatorios, incluyendo TNF $\alpha$ , IL-8 [DeForge, Preston, *et al.* 1993], y moléculas de adhesión de unión a neutrófilos [Lo, Janakidevi, *et al.* 1993]. De entre este último grupo, VCAM-1 une

monocitos y linfocitos T, que son precisamente los tipos de leucocitos hallados en los ateromas humanos tempranos y los ateromas experimentales.

La aterosclerosis es una de las principales causas de la cardiomiopatía isquémica, constituyendo así uno de los mecanismos que hace a la obesidad uno de los principales factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular [Libby, Ridker, *et al.* 2002]. En relación a los hallazgos previos del grupo, donde se habían encontrado niveles menores de adiponectina y mayores de IL-6 en TAE que estaban asociados a la extensión de la enfermedad coronaria [Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008]; podría tenerse en cuenta que tanto adiponectina como catalasa están reguladas por el factor de transcripción PPAR $\gamma$  [Tsuchida, Yamauchi, *et al.* 2005, Okuno, Matsuda, *et al.* 2008]. PPAR $\gamma$  también regula el metabolismo de lípidos y glúcidos [Lowell 1999, Kersten, Desvergne, *et al.* 2000]. Sin embargo, es necesario profundizar en nuevos estudios para determinar la importancia relativa de la baja expresión de catalasa en tejido adiposo epicárdico y su mecanismo de regulación. Así, los resultados mostrados aquí sugieren que la menor expresión de catalasa podría estar favoreciendo el estrés oxidativo de manera más intensa en el TAE que en el TAS, lo cual se corresponde tanto con su acción anti-oxidante como con los niveles altos de productos de ROS detectadas en el TAE.

Otras proteínas que difieren en cuanto a grasa epicárdica y subcutánea en el presente estudio fueron GSTP1 y PDIA1. En estos casos, el TAE y el TAS difieren en cuanto a sus correspondientes niveles de ARNm (donde epicárdica presenta niveles más altos en ambos casos), pero no en cuanto a los niveles de proteína determinados por western blot 1DE. Aunque las diferencias entre estos tejidos adiposos fueron mayores en pacientes con cardiopatía isquémica, no se han hallado cambios en los niveles de proteína. Los resultados de western blot 2DE sugieren que esta aparente discrepancia entre la expresión génica y proteica podría ser debida a modificaciones postraduccionales, ya que se han observado diferencias entre el TAE y el TAS en cuanto a los patrones de manchas para estas proteínas. Además, como describen Sam y colaboradores, por un lado el incremento de los niveles de ARNm de varios enzimas anti-oxidantes podría sugerir un esfuerzo para normalizar los niveles de estrés oxidativo y, por otro lado, la disminución de la expresión proteica podría sugerir una modificación postraduccional con degradación acelerada [Sam, Kerstetter, *et al.* 2005].

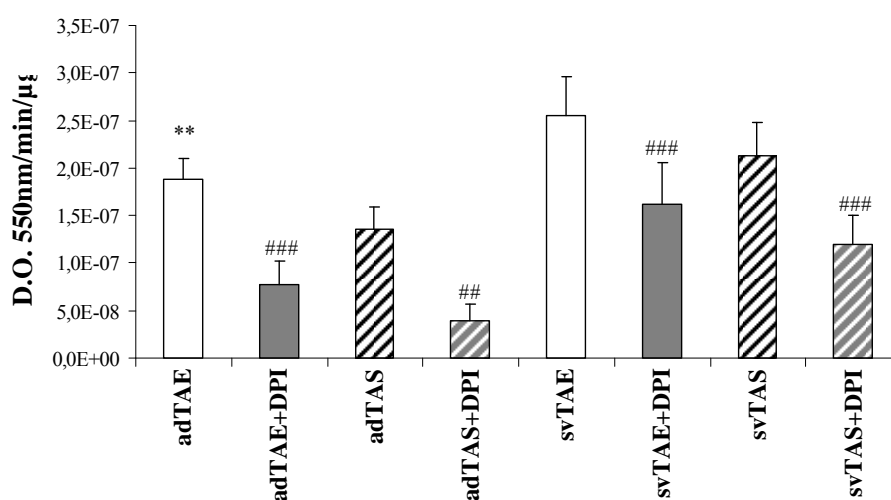
El enzima detoxificante GSTP1 está presente en el citosol, núcleo y mitocondria de todos los organismos aeróbicos, y les confiere protección frente al estrés oxidativo [Griendling y FitzGerald 2003]. En este enzima, se conocen modificaciones postraduccionales como son glicosilación y fosforilación en residuos de serina y treonina [Ranganathan, Whalen, *et al.* 2005]. Los ensayos de inmunoprecipitación han mostrado que esta proteína puede estar fosforilada en el TAE y el TAS. En este estudio, GSTP1 aparece como tres manchas en el western blot 2DE, una de las cuales fue más intensa en el TAE que en el TAS. Esta mancha era la más catiónica, pudiendo ser la isoforma no fosforilada. De esta manera, se han observado niveles mayores de expresión de ARNm para GSTP1 en grasa epicárdica que en subcutánea. Por el contrario, el western blot 1DE no ha sido suficientemente cuantitativo para detectar cambios en los niveles de GSTP1 entre los dos tejidos. Sin embargo, el western blot 2DE si que ha sido capaz de mostrar esas diferencias.

PDIA1 es una proteína disulfuro isomerasa (PDI) que pertenece a la ruta de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), lo cual en un principio alivia el estrés del retículo endoplásmico. Ratones con enfermedad isquémica de corazón y que sobreproducen PDIs muestran una reducción marcada del tamaño de infarto y una reducción significativa de la apoptosis cardiomiocitaria en la región peri-infarto [Severino, Campioni, *et al.* 2007]. Sin embargo, una activación prolongada de la ruta UPR puede causar una acumulación de ROS dentro de la célula que resulta tóxica. En este estudio, el western blot 2DE ha mostrado diferentes patrones de manchas de PDIA1 en el TAE y el TAS, sugiriendo que existe una modificación postraducciona adicional en el TAE. Es tentador especular que esta modificación sea la S-nitrosilación que ha sido demostrada en células endoteliales durante un estado de hipoxia transitoria [Chen, Huang, *et al.* 2008]. Sin embargo, mediante inmunoprecipitación también se ha podido observar que PDIA1 puede estar fosforilado en este tejido.

PGAM1 podría contribuir a incrementar el flujo glicolítico como respuesta a hipoxia, ya que los niveles de PGAM1 aumentan en fibroblastos cultivados en condiciones de hipoxia [Takahashi, Takahashi, *et al.* 1998]. Un incremento en la glicolisis ha sido asociado con protección frente a estrés oxidativo [Kondoh, Leonart, *et al.* 2007]. Además, esta proteína presenta varios sitios de fosforilación. En este estudio no se han encontrado diferencias entre el TAE y el TAS en cuanto a los niveles de

ARNm o proteína, pero el western blot 2DE ha mostrado cuatro manchas en tejido epicárdico frente a sólo tres en subcutáneo.

La importancia de los todos los resultados mencionados anteriormente está limitada por el hecho de que, debido a la escasez de tejido adiposo epicárdico, no todos los ensayos fueron realizados con los mismos pacientes, aunque las características clínicas generales de todos los grupos fueron similares. Además, no se han podido obtener muestras de pacientes sin enfermedad cardiovascular equiparables para hipertensión, *diabetes mellitus* e hiperlipidemia que se sometan a una esternotomía, debido a motivos éticos. Por esta razón, no se han podido estudiar las diferencias de expresión entre pacientes con y sin enfermedad cardiovascular, lo cual sería muy interesante.



**Figura 12.** Ensayo de reducción NBT sobre fracción adipocitaria o estromal-vascular de TAE y TAS procedente de 10 pacientes. El diagrama de barras muestra las pendientes del incremento de densidad óptica con el tiempo corregido con los  $\mu\text{g}$  de proteína para cada paciente. En la figura se muestran diferencias significativas en la fracción adipocitaria entre TAE y TAS (\*\* $p < 0.01$ ), mientras que no se observan cambios en la fracción estromal-vascular. Como inhibidor de la reacción ha sido usado el DPI, disminuyendo la señal en todas las muestras (### $p < 0.01$ ; #### $p < 0.001$ ).

Esta es la primera demostración de que el TAE presenta niveles de estrés oxidativo mayores que el TAS en pacientes con enfermedad cardiovascular. El análisis proteómico ha determinado modificaciones postraduccionales de enzimas anti-oxidantes (GSTP1, PDIA1 y PGAM1) y una menor expresión de catalasa en grasa epicárdica con respecto a grasa subcutánea. Nuestros hallazgos sugieren una posible relación entre

estos enzimas y el estrés oxidativo. Los cambios de expresión de ARNm entre los dos tejidos podrían ser explicados en parte por la composición celular, la enfermedad cardiovascular o ambas. Sin embargo, aunque son necesarias futuras aproximaciones mecánísticas para comprender el proceso, se ha observado un mayor estrés oxidativo en la fracción adipocitaria del tejido adiposo epicárdico comparándola con la del subcutáneo, mientras que no se han detectado diferencias entre ambas fracciones estromales (Figura 12).

Dado que el tejido adiposo se extiende desde la superficie epicárdica al interior del miocardio, a menudo siguiendo la adventicia de las ramificaciones de las arterias coronarias sin ninguna estructura fascial que lo separe del tejido miocárdico [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005], parece posible que un incremento en el estrés oxidativo pueda acompañar una situación similar en los tejidos coronario y miocárdico adyacentes, posiblemente con el desarrollo de interacciones paracrinas.



# CAPÍTULO CUATRO

## METODOLOGÍA Y RESULTADOS II

“Cambios en proteínas implicadas en el transporte de lípidos del tejido adiposo  
epicárdico se asocian con la cardiopatía isquémica”

*“Changes in lipid transport-involved proteins of epicardial adipose tissue associated  
with coronary artery disease”*



## CAPÍTULO CUATRO: METODOLOGÍA Y RESULTADOS II

### Introducción al capítulo cuatro

La obesidad está aumentando en nuestra sociedad y junto con otros factores como la dislipemia, la hipertensión y la diabetes constituye el síndrome metabólico, lo cual está considerado como el riesgo principal para sufrir enfermedad cardiovascular. En general, existe una fuerte relación entre la adiposidad corporal y la cantidad de tejido adiposo que rodea el miocardio y las coronarias [Rabkin 2007]. Los estudios de tomografía computerizada o ecocardiografía han hallado una amplia asociación entre TAE, síndrome metabólico y cardiopatía isquémica [Gorter, van Lindert, *et al.* 2008, Iacobellis, Willens, *et al.* 2008, Wang, Lee, *et al.* 2009].

A lo largo de los últimos años, la comunidad científica ha tratado de explicar este hecho observable a través del estudio de la expresión de adipoquinas en TAE con respecto a TAS en pacientes con y sin CI. De este modo, se ha observado que el TAE expresa niveles de citoquinas pro-inflamatorias —como TNF- $\alpha$ , IL-6, visfatina y leptina [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Kremen, Dolinkova, *et al.* 2006]—, péptidos relacionados con la presión arterial —como angiotensinógeno [Roubicek, Dolinkova, *et al.* 2008] y adrenomedulina [Silaghi, Achard, *et al.* 2007]— o productores de ácidos grasos libres —como fosfolipasa A2 secretora tipo II [Dutour, Achard, *et al.* 2010]— en enfermedad coronaria. Por el contrario, se han detectado niveles disminuidos de adiponectina (una adipoquina anti-inflamatoria) en TAE de pacientes con hipertensión o CI asociada, pero no en diabetes [Iacobellis, Pistilli, *et al.* 2005, Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008, Teijeira-Fernandez, Eiras, *et al.* 2008, Teijeira-Fernandez, Eiras, *et al.* 2010].

La mayoría de los estudios están enfocados en hallar las relaciones entre TAE y las adipoquinas implicadas en el proceso de inflamación. En la pasada década, los análisis proteómicos han generado un conocimiento global de cambios en proteínas en un tejido, a veces asociados a una enfermedad. Estos estudios nos proporcionan información sobre qué es lo que está ocurriendo en el tejido, como por ejemplo un aumento en la inflamación [Buhimschi, Buhimschi, *et al.* 2005], degradación de proteínas [Xu, Duong, *et al.* 2009], fibrogénesis [Mas, Fisher, *et al.* 2009], etc. De hecho, nuestro grupo ha encontrado que el TAE contiene niveles de radicales libres más altos con respecto al TAS mediante un análisis proteómico como se ha descrito en el capítulo anterior. La grasa epicárdica es más que un órgano para el almacén de energía,

por la razón de que medio condicionado por este tejido de pacientes con CI induce cambios inflamatorios en monocitos y células endoteliales coronarias humanas [Karastergiou, Evans, *et al.* 2010]. Todos estos hallazgos sugieren que el TAE es un órgano secretor de péptidos que podría modular la aterosclerosis. Por ello se ha considerado que el estudio del secretoma de explantes de TAE y TAS podría contribuir al mejor entendimiento del papel endocrino y paracrino entre ambos tejidos grasos. Además, el estudio global del análisis proteómico y secretómico entre pacientes con/sin CI podría ayudar a conocer los mecanismos fisiopatológicos de la aterosclerosis coronaria, con el objetivo de identificar alguna diana terapéutica potencialmente útil en el futuro.

## **Metodología II**

### ***Pacientes***

Se han recogido biopsias de TAE y TAS de 64 pacientes (71±9 años, 29±4kg/m<sup>2</sup>, 67,2% hombres, 76,6% hipertensos, 26,6% diabéticos, 53,1% hiperlipidémicos y 51,6% con CI) que se habían sometido a cirugía cardíaca (reemplazo valvular, revascularización coronaria o ambos). Los criterios de exclusión fueron cirugía cardíaca previa y/o enfermedades infecciosas graves. Todos los participantes habían dado su consentimiento informado por escrito. El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el Comité de Investigación Clínica de Galicia (comité ético local) y llevado a cabo según la Declaración de Helsinki.

El grupo de CI fue definido de acuerdo con la presencia de al menos una estenosis coronaria ≥50% del diámetro del lumen medido mediante un angiograma coronario. Las biopsias de TAE y TAS fueron obtenidas, transportadas al laboratorio en PSS y tratadas para su almacenaje como se ha descrito previamente.

### ***Extracción de ARNm y proteína***

Para su posterior utilización en las distintas técnicas, los tejidos se procesaron como se ha descrito anteriormente para obtener soluciones que contenían el ARNm o la proteína de las distintas muestras.

### ***Cultivo de explantes de tejido adiposo***

Los explantes de tejido adiposo fueron transportados en PSS desde el quirófano hasta el laboratorio. Tras centrifugar para eliminar las células sanguíneas, se cortaron TAE y TAS en pedazos de 100mg, se lavaron en PSS y se colocaron en una placa de cultivo de 24 pocillos a la que se añadieron 0,5mL de M-199 con antibióticos (100UI/mL de penicilina y estreptomina a una concentración de 100µg/mL). Los explantes de tejido adiposo fueron cultivados a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante el experimento. Los medios de cultivo fueron recogidos a las 3 horas del cultivo y reemplazados por 0,5mL de medio fresco. De igual forma, los medios de cultivo fueron recogidos y reemplazados por medio fresco a las 6 y 24 horas tras el cultivo. Finalmente, los medios y los tejidos fueron recogidos a las 48 horas después del cultivo. Tanto los medios de cultivo como los tejidos fueron almacenados a -40°C hasta su utilización.

### ***Electroforesis mono-dimensional (IDE)***

Tejido adiposo epicárdico y subcutáneo procedente de 12 pacientes ( $70 \pm 9$  años,  $31 \pm 3 \text{ kg/m}^2$ , 50% hombres, 83% hipertensos, 58% diabéticos, 67% hiperlipidémicos y 50% con cardiopatía isquémica) fueron utilizados para este análisis. El medio de cultivo de los explantes de tejido se concentró 10 veces (de 0,5mL a 0,05mL) usando el sistema de columnas Amicon Ultra 0,5mL 3K (Millipore Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda). Para la visualización de la proteína secretada, se mezclaron 15µL de medio de cultivo concentrado con solución Laemmli y se hirvió la muestra a 100°C durante 10'. La separación de proteínas fue llevada a cabo a 100V durante 20h en un gel desnaturante de poli-acrilamida con una concentración creciente de 10% a 20% (con un incremento de un 2% entre las secciones consecutivas). De cada vez se han corrido dos geles al mismo tiempo. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie y digitalizados usando el escáner GS800 (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas usando el programa informático Quantity One 4.6.5 (Bio-Rad).

### ***Electroforesis bi-dimensional (2DE) e identificación de proteínas***

La 2DE ha sido llevada a cabo sobre muestras pareadas de TAE y TAS procedentes de 8 pacientes de sexo masculino ( $66 \pm 10$  años,  $29 \pm 4 \text{ kg/m}^2$ , 37,5% hipertensos, 12,5% diabéticos y 50% con CI). Dentro de los pacientes con CI el 50% eran hipertensos y el 25% diabéticos. El protocolo de 2DE fue realizado como se ha descrito en el capítulo anterior con algunas modificaciones. Así, para la separación por punto isoeléctrico se utilizaron tiras IPG de 13cm con pH 4-7NL (GE Healthcare) y la separación por peso molecular se hizo en geles desnaturantes de poli-acrilamida al 13%. Se corrieron cuatro geles al mismo tiempo a 120V durante 1h y a 50mA durante 6h. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie y digitalizados mediante el sistema de captación de imágenes VersaDoc (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas usando el programa REDFIN 3 (LUDESI).

La identificación de las proteínas contenidas en las bandas o manchas de interés se realizó del mismo modo que se ha detallado en el capítulo anterior.

**Inmunoensayo enzimático (EIA)**

Se cargó por duplicado una dilución 1:3000 de medio de cultivo concentrado, mezclando partes iguales de todos los tiempos recogidos. La concentración de proteína para FABP4 fue medida mediante un kit de EIA comercial (SPIbio), que presenta un límite de detección de analito de 0,1ng/mL.

**Análisis por western blot**

El medio de cultivo concentrado de 16 pacientes ( $69 \pm 8$  años,  $31 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup>, 63% hombres, 81% hipertensos, 44% diabéticos, 56% hiperlipidémicos y 50% con CI) fue analizado mediante la inmunodetección de proteínas específicas. Previamente se mezclaron volúmenes iguales de medio de cultivo de todos los tiempos recogidos. Se añadió tampón Laemmli y se hirvió la mezcla a 100°C durante 5'. Posteriormente, 5µL de la proteína secretada total fueron separados mediante electroforesis en un gel de poli-acrilamida al 13% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos frente a APOA1 y GSTP1 (Santa Cruz Biotechnology) fueron utilizados a una dilución 1:250 y fueron detectados usando EnVision FLEX conjugado con peroxidasa (DakoDiagnostics).

El western blot para la detección de ACTB (1:2000), APOA1 (1:250), CLIC1 (1:200), FABP4 (1:100), o GSTP1 (1:1000) a partir de 6-10µL de tejido homogeneizado se realizó sobre membranas de nitrocelulosa o PVDF expuestas a IgG de cabra anti-ratón o EnVision FLEX conjugados con peroxidasa. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron usando un sistema de detección potenciador de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Ltd, London, UK). La cuantificación se realizó por densitometría mediante el programa informático Image J, utilizando como control interno ACTB en las medidas de expresión proteica.

**RT-PCR en tiempo real**

El proceso de retrotranscripción y amplificación para el análisis comparativo de expresión de ARNm se llevó a cabo tal y como se ha descrito en la metodología del capítulo anterior. Los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación se describen en la tabla del Anexo 1. Se comprobaron las curvas de disociación y los valores en unidades arbitrarias se obtuvieron usando el anti-logaritmo de la fórmula  $Ct_1(ACTB)/Ct_2(\text{genes de interés})$ .

### ***Inmunohistoquímica***

El TAE fue fijado en formol, embebido en parafina y cortado en secciones de 4µm de grosor. Una vez desparafinadas, las muestras fueron pretratadas como se ha descrito anteriormente. Los cortes histológicos fueron expuestos a una dilución 1:200 de anticuerpo anti-APOA1 durante 30' y el revelado se ha llevado a cabo de manera similar a lo realizado en el capítulo tres.

### ***Análisis estadístico***

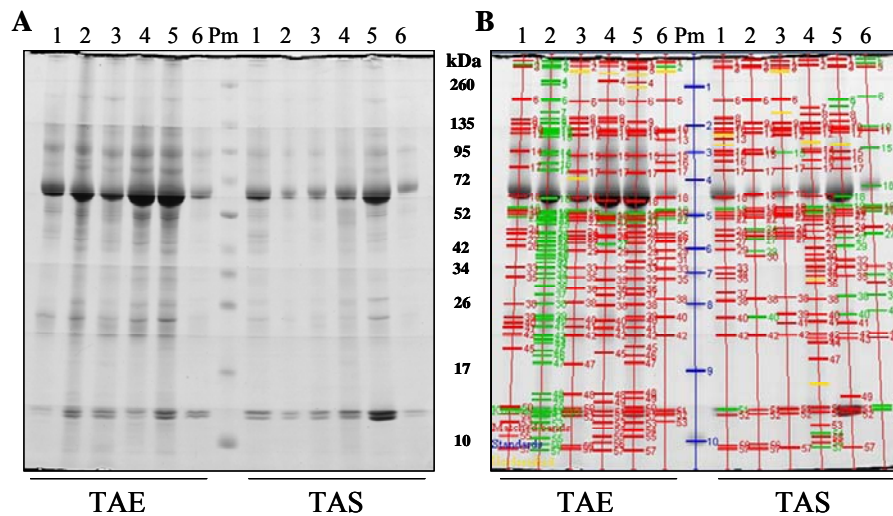
Los resultados se muestran como media±desviación estándar. La normalidad de las variables continuas fue comprobada con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre TAE y TAS han sido analizadas con un test *t* de Student para muestras pareadas. Las diferencias entre grupos fueron determinadas por medio de un test *t* de Student. Los resultados se muestran como media±desviación estándar. La significatividad estadística ha sido definida como  $p < 0,05$ . El análisis estadístico fue realizado usando el programa informático SPSS 15.0 para Windows.



## Resultados II

### Análisis mono-dimensional de la secreción del tejido adiposo

Se realizaron cultivos de explantes de tejido adiposo epicárdico y subcutáneo durante 48 horas. Sin embargo, se hipotetizó que la recogida de medio de cultivo a diferentes tiempos podría ser útil para entender los patrones de secreción de ambos tejidos. Así, se recogió el medio de cultivo a dos tiempos cortos (3 y 6 horas) y a dos tiempos largos (24 y 48 horas). Luego, se realizó la separación del total de proteínas secretadas a 3, 6, 24 o 48 horas de cultivo mediante 1DE, porque de esta forma podrían visualizarse las proteínas secretadas por el TAE y el TAS de 6 pacientes; reduciendo así la variabilidad inter-ensayo. En un principio, las proteínas secretadas para cada uno de los tiempos fueron analizadas de forma independiente.



**Figura 13. A.** Imagen representativa de un gel de 1DE. **B.** Determinación de las bandas de un gel mediante el programa informático Quantity One. Los números sobre los geles determinan muestras de un mismo paciente; entre los geles se indica el peso molecular (Pm).

La primera observación fue que la misma cantidad de TAE en cultivo secreta al medio niveles de proteína más elevados que el TAS a todos los tiempos como se muestra en el Figura 13A con una pareja de geles representativa. Las proteínas visualizadas se reconocieron como bandas y fueron emparejadas en todos los geles mediante el programa informático Quantity One, como se muestra en el Figura 13B. En total se detectaron 72 bandas. Sin embargo, debido a la mayor actividad secretora del tejido adiposo epicárdico frente al subcutáneo, las diferencias entre la secreción de

ambos tejidos se analizaron de dos maneras: a) con respecto al pico de densidad óptica de cada banda (PDO); y b) con respecto a la densidad óptica relativa de la cantidad total de intensidad de las bandas (CR).

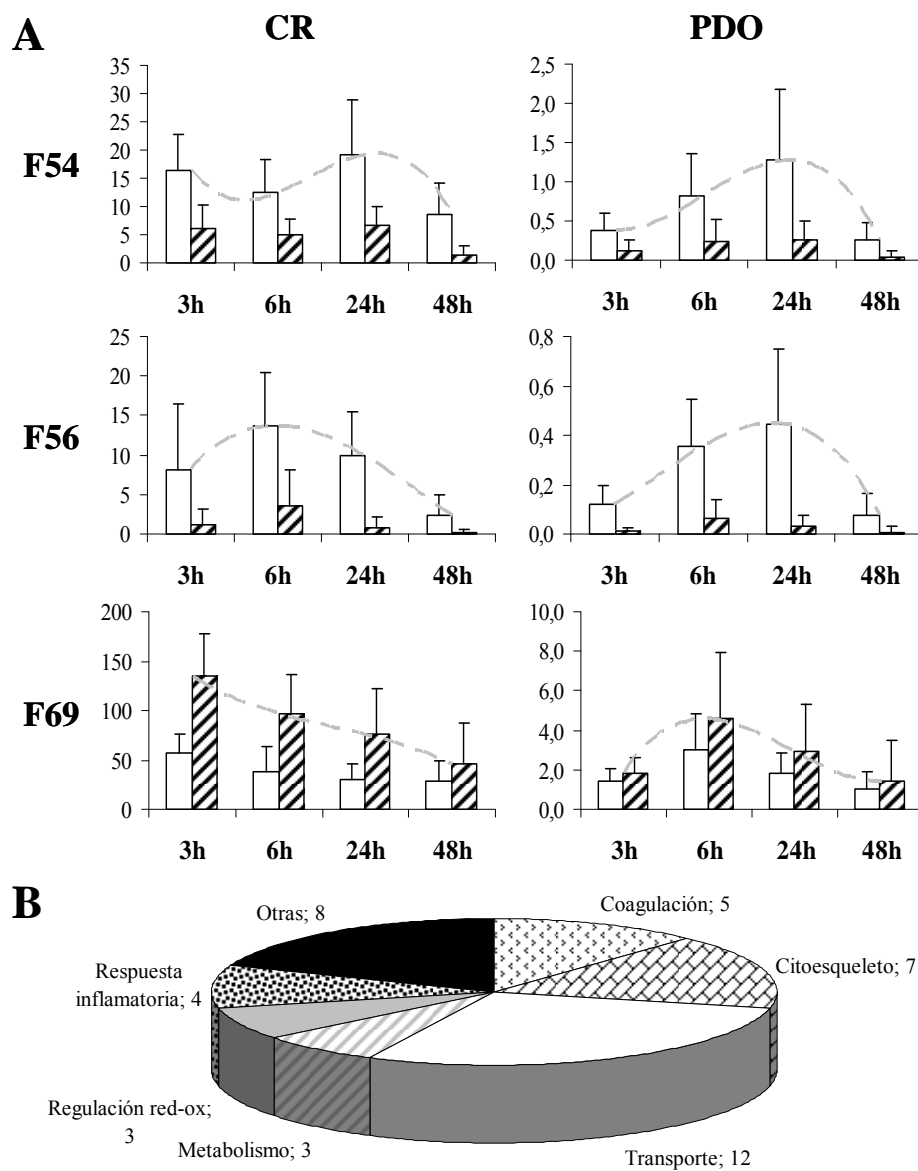
**Tabla 3.** Identificación de las proteínas contenidas en cada una de las bandas mediante MALDI-TOF/Mascot. Las identificaciones fueron excluidas según la diferencia del peso molecular (Pm) observado (O) frente al teórico (T) según la fórmula indicada  $((O-T)/T)$  como porcentaje. Los pesos teóricos han sido obtenidos de ExPASy Proteomic Server.

#Banda	Nombre de acceso	Nombre	Pm O	T	$((O-T)/T)*100$	M.S.
F11	A2MG_HUMAN	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	204865	160810	27,40	482
F19	VINC_HUMAN	<i>Vinculin</i>	126012	123668	1,90	101
F24	F13A_HUMAN	<i>Coagulation factor XIII A chain</i>	84919	79245	7,16	255
	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>		66472	27,75	60
F25	TRFE_HUMAN	<i>Serotransferrin</i>	79340	75195	5,51	342
F28	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>	60694	66472	-8,69	805
F30	G6PI_HUMAN	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	53972	63016	-14,35	211
	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>		66472	-18,81	387
	A1AT_HUMAN	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>		44325	21,77	630
F31	A1AT_HUMAN	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	52699	44325	18,89	328
	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>		66472	-20,72	279
F32	UGPA_HUMAN	<i>UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>	51477	56809	-9,39	151
	A1AT_HUMAN	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>		44325	16,14	396
	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>		66472	-22,56	288
F33	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>	50583	66472	-23,90	235
F34	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>	49305	66472	-25,83	324
F38	VIME_HUMAN	<i>Vimentin</i>	45261	53520	-15,43	362
F39	FAAA_HUMAN	<i>Fumarylacetoacetase</i>	44117	46243	-4,60	104
	ACTBM_HUMAN	<i>Putative beta-actin-like protein 3</i>		42016	5,00	115
	ACTBL_HUMAN	<i>Beta-actin-like protein 2</i>		42003	5,03	111
	ACTS_HUMAN	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>		41817	5,50	223
	ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>		41793	5,56	416
	ACTC_HUMAN	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>		41785	5,58	224
F40	VIME_HUMAN	<i>Vimentin</i>	42771	53520	-20,08	99
F41	FIBB_HUMAN	<i>Fibrinogen beta chain</i>	41486	50763	-18,28	194
	VIME_HUMAN	<i>Vimentin</i>	41486	53520	-22,49	159
F46	MDHC_HUMAN	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	33727	36295	-7,08	56
F48	MDHC_HUMAN	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	32426	36295	-10,66	178
F52	1433G_HUMAN	<i>I4-3-3 protein gamma</i>	26117	28303	-7,72	146

F53	APOA1_HUMAN	<i>Apolipoprotein A-I</i>	24156	28079	-13,97	48
F54	APOA1_HUMAN	<i>Apolipoprotein A-I</i>	23601	28079	-15,95	528
F56	GSTP1_HUMAN	<i>Glutathione S-transferase P</i>	22613	23225	-2,63	78
F60	PRDX2_HUMAN	<i>Peroxiredoxin-2</i>	20174	21761	-7,29	86
F61	PEBP1_HUMAN	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	19213	20926	-8,18	50
F66	TTHY_HUMAN	<i>Transthyretin</i>	14251	13761	3,56	58
F67	H2A1J_HUMAN	<i>Histone H2A type 1-J</i>	13669	13805	-0,99	85
	H2A2C_HUMAN	<i>Histone H2A type 2-C</i>		13857	-1,36	89
	H2AJ_HUMAN	<i>Histone H2A.J</i>		13888	-1,58	84
	H2A1_HUMAN	<i>Histone H2A type 1</i>		13960	-2,09	84
	H2A2A_HUMAN	<i>Histone H2A type 2-A</i>		13964	-2,11	83
F68	CYTC_HUMAN	<i>Cystatin-C</i>	12835	13347	-3,84	59
	LYSC_HUMAN	<i>Lysozyme C</i>		14701	-12,69	54
F69	FABP4_HUMAN	<i>Fatty acid binding protein, adipocyte</i>	12486	14588	-14,41	436
	MYP2_HUMAN	<i>Myelin P2 protein</i>		14778	-15,51	79
	HBB_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit beta</i>		15867	-21,31	727
	HBD_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit delta</i>		15924	-21,59	294
	HBG2_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit gamma-2</i>		15995	-21,94	73
	HBG1_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit gamma-1</i>		16009	-22,01	71
	HBE_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit epsilon</i>		16072	-22,31	64
F70	HBA_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	12118	15126	-19,89	427
	HBB_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit beta</i>		15867	-23,63	63
	HBD_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit delta</i>		15924	-23,90	44
F71	B2MG_HUMAN	<i>Beta-2-microglobulin</i>	11513	11731	-1,86	60
	MIF_HUMAN	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>		12345	-6,74	57
F72	S10A8_HUMAN	<i>Protein S100-A8</i>	10991	10835	1,44	46
	CH10_HUMAN	<i>10 kDa heat shock protein mitochondrial</i>		10801	1,76	68

Las bandas fueron reconocidas e identificadas como una o más proteínas mediante espectrometría de masas. Las identificaciones de las bandas están resumidas en la Tabla 3. Las proteínas identificadas se clasificaron como de coagulación, citoesqueléticas, de transporte, del metabolismo, proteínas implicadas en el balance oxidación-reducción o en la respuesta inflamatoria y otras funciones.

La cantidad de proteínas incluidas en cada grupo se representan en la Figura 14B. La Tabla 4 muestra las diferencias estadísticas entre TAE y TAS para las bandas identificadas con éxito tras ser analizadas con respecto al PDO o CR.



**Figura 14. A.** Patrones de secreción representativos correspondientes a las bandas F54, F56 y F69, dependiendo del método de análisis a) pico de densidad óptica de la banda relativo a la intensidad de todas las bandas (CR) b) pico de densidad óptica de la banda (PDO). Las barras lisas corresponden al TAE y las rayadas al TAS **B.** Representación gráfica de la distribución de las proteínas identificadas con respecto a su función.

**Tabla 4.** Análisis estadístico. La columna PDO indica los picos de densidad óptica como unidades arbitrarias; la columna CR indica la densidad óptica como unidades arbitrarias relativas a la densidad total de cada línea. Los datos están representados como media(desviación estándar) y las bandas no detectadas aparecen en gris. Las diferencias estadísticamente significativas entre TAE y TAS están resaltadas en negrita y representadas como <sup>a</sup> $p<0,05$ , <sup>b</sup> $p<0,01$  o <sup>c</sup> $p<0,001$ .

#Banda		3h		6h		24h		48h	
		PDO	CR	PDO	CR	PDO	CR	PDO	CR
F11	E	<b>0,11(0,08)<sup>b</sup></b>	<b>5,33(2,92)<sup>c</sup></b>	<b>0,13(0,08)<sup>a</sup></b>	1,86(1,37)	<b>0,15(0,10)<sup>b</sup></b>	2,64(2,00)	<b>0,04(0,03)<sup>b</sup></b>	<b>1,01(0,93)<sup>a</sup></b>
	S	<b>0,03(0,03)</b>	<b>1,84(1,60)</b>	<b>0,06(0,05)</b>	1,27(1,30)	<b>0,06(0,05)</b>	1,89(1,27)	<b>0,02(0,03)</b>	<b>0,42(0,74)</b>
F19	E	<b>0,21(0,13)<sup>a</sup></b>	7,47(5,19)	<b>0,58(0,27)<sup>c</sup></b>	<b>8,96(2,98)<sup>c</sup></b>	0,25(0,32)	2,26(2,60)	0,21(0,15)	5,42(3,73)
	S	<b>0,10(0,06)</b>	5,20(2,28)	<b>0,20(0,09)</b>	<b>3,53(1,25)</b>	0,15(0,08)	3,45(2,35)	0,11(0,07)	5,23(2,76)
F24	E	0,02(0,02)	0,43(0,59)	0,02(0,05)	0,13(0,44)	0,05(0,09)	0,71(1,06)	<b>0,03(0,03)<sup>b</sup></b>	<b>0,47(0,63)<sup>a</sup></b>
	S	0,01(0,01)	0,13(0,32)	0,00(0,01)	0,01(0,03)	0,01(0,02)	0,13(0,27)	<b>0,00(0,00)</b>	<b>0,02(0,05)</b>
F25	E	<b>0,06(0,07)<sup>a</sup></b>	3,70(4,14)	<b>0,73(0,52)<sup>b</sup></b>	<b>15,04(9,22)<sup>b</sup></b>	<b>0,61(0,43)<sup>c</sup></b>	<b>12,04(6,72)<sup>c</sup></b>	0,04(0,07)	1,25(2,08)
	S	<b>0,03(0,05)</b>	2,09(2,91)	<b>0,18(0,21)</b>	<b>5,24(3,13)</b>	<b>0,10(0,12)</b>	<b>3,09(2,73)</b>	0,01(0,01)	0,07(0,11)
F28	E	<b>4,74(1,23)<sup>c</sup></b>	<b>510,53(96,03)<sup>c</sup></b>	<b>10,26(3,43)<sup>b</sup></b>	<b>455,08(68,48)<sup>c</sup></b>	<b>10,12(3,51)<sup>c</sup></b>	<b>439,90(94,20)<sup>c</sup></b>	<b>3,44(2,77)<sup>b</sup></b>	<b>176,35(104,27)<sup>b</sup></b>
	S	<b>2,59(1,43)</b>	<b>345,47(109,49)</b>	<b>5,25(3,89)</b>	<b>275,86(88,98)</b>	<b>4,83(3,42)</b>	<b>297,83(120,04)</b>	<b>0,98(1,20)</b>	<b>63,91(53,69)</b>
F30	E	<b>0,14(0,10)<sup>a</sup></b>	<b>4,51(2,85)<sup>a</sup></b>	<b>0,95(0,60)<sup>b</sup></b>	<b>10,31(5,95)<sup>b</sup></b>	<b>1,04(0,87)<sup>b</sup></b>	<b>10,11(6,84)<sup>b</sup></b>	<b>0,16(0,17)<sup>b</sup></b>	<b>2,77(2,45)<sup>a</sup></b>
	S	<b>0,07(0,06)</b>	<b>3,09(2,16)</b>	<b>0,26(0,31)</b>	<b>3,35(2,35)</b>	<b>0,16(0,14)</b>	<b>2,17(1,24)</b>	<b>0,03(0,05)</b>	<b>0,66(0,71)</b>
F31	E	0,17(0,10)	5,96(3,35)	<b>0,91(0,64)<sup>b</sup></b>	<b>10,45(6,35)<sup>b</sup></b>	<b>1,26(0,96)<sup>b</sup></b>	<b>11,63(5,92)<sup>c</sup></b>	<b>0,15(0,18)<sup>b</sup></b>	<b>2,45(2,67)<sup>a</sup></b>
	S	0,11(0,07)	5,90(3,31)	<b>0,30(0,35)</b>	<b>4,09(2,02)</b>	<b>0,19(0,19)</b>	<b>3,03(1,79)</b>	<b>0,01(0,02)</b>	<b>0,16(0,36)</b>
F32	E	<b>0,15(0,09)<sup>b</sup></b>	4,60(3,25)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	<b>1,33(1,03)<sup>b</sup></b>	<b>13,28(6,94)<sup>c</sup></b>	0,11(0,18)	2,00(3,36)
	S	<b>0,07(0,05)</b>	3,47(2,29)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	<b>0,23(0,22)</b>	<b>3,85(2,15)</b>	0,02(0,03)	0,36(0,76)
F33	E	0,05(0,10)	1,18(1,91)	<b>0,33(0,32)<sup>a</sup></b>	4,99(5,81)	<b>0,68(0,73)<sup>b</sup></b>	<b>7,01(4,88)<sup>b</sup></b>	0,00(0,00)	0,00(0,00)
	S	0,02(0,03)	0,94(1,39)	<b>0,10(0,17)</b>	1,54(1,72)	<b>0,08(0,08)</b>	<b>1,56(1,29)</b>	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F34	E	0,04(0,07)	1,81(3,88)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,46(0,66)	6,51(8,89)	0,11(0,17)	4,12(7,70)
	S	0,01(0,01)	0,46(1,11)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,04(0,09)	1,55(3,43)	0,01(0,02)	0,41(0,90)
F38	E	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,24(0,26)	2,68(2,18)	<b>0,12(0,10)<sup>b</sup></b>	2,55(2,13)
	S	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,10(0,13)	3,93(4,48)	<b>0,03(0,05)</b>	1,34(2,42)
F39	E	<b>0,15(0,05)<sup>c</sup></b>	<b>7,65(3,28)<sup>b</sup></b>	<b>0,27(0,18)<sup>a</sup></b>	3,58(1,83)	<b>0,38(0,37)<sup>a</sup></b>	4,55(3,13)	0,03(0,05)	0,72(1,35)
	S	<b>0,07(0,03)</b>	<b>5,05(2,67)</b>	<b>0,12(0,11)</b>	2,48(1,78)	<b>0,10(0,09)</b>	2,66(2,16)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F40	E	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,10(0,22)	0,66(1,47)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
	S	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,06(0,09)	2,99(3,88)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F41	E	0,12(0,09)	7,03(4,71)	0,23(0,23)	4,03(3,82)	<b>0,22(0,25)<sup>a</sup></b>	<b>4,07(3,51)<sup>a</sup></b>	<b>0,05(0,05)<sup>b</sup></b>	<b>1,47(1,43)<sup>b</sup></b>
	S	0,06(0,08)	4,91(5,65)	0,11(0,09)	3,30(2,75)	<b>0,03(0,05)</b>	<b>1,02(1,76)</b>	<b>0,01(0,02)</b>	<b>0,08(0,18)</b>
F46	E	<b>0,06(0,05)<sup>a</sup></b>	2,40(2,12)	0,04(0,08)	<b>0,43(0,87)<sup>a</sup></b>	0,02(0,05)	0,11(0,36)	0,02(0,03)	0,55(1,07)
	S	<b>0,03(0,03)</b>	1,83(2,75)	0,09(0,09)	<b>1,53(1,46)</b>	0,05(0,07)	1,07(1,79)	0,02(0,04)	0,36(0,88)
F48	E	<b>0,10(0,05)<sup>b</sup></b>	5,03(3,21)	<b>0,17(0,10)<sup>a</sup></b>	<b>3,68(2,49)<sup>a</sup></b>	<b>0,25(0,18)<sup>b</sup></b>	<b>6,36(3,21)<sup>a</sup></b>	0,06(0,06)	1,57(1,70)
	S	<b>0,05(0,04)</b>	3,31(2,39)	<b>0,09(0,07)</b>	<b>1,60(1,25)</b>	<b>0,07(0,06)</b>	<b>2,61(2,38)</b>	0,03(0,04)	1,20(1,73)
F52	E	0,09(0,03)	<b>5,49(3,30)<sup>a</sup></b>	0,17(0,09)	2,58(1,66)	<b>0,31(0,27)<sup>a</sup></b>	6,18(4,38)	0,12(0,14)	3,21(3,97)
	S	0,12(0,09)	<b>9,97(4,31)</b>	0,16(0,23)	3,16(2,73)	<b>0,11(0,10)</b>	3,39(2,61)	0,05(0,10)	1,12(1,61)
F53	E	<b>0,06(0,04)<sup>c</sup></b>	<b>1,65(1,03)<sup>b</sup></b>	0,03(0,05)	0,21(0,39)	<b>0,21(0,27)<sup>b</sup></b>	3,78(6,83)	<b>0,09(0,12)<sup>a</sup></b>	2,21(3,11)
	S	<b>0,00(0,01)</b>	<b>0,19(0,64)</b>	0,01(0,02)	0,22(0,77)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	<b>0,01(0,03)</b>	0,27(0,67)

F54	E	0,39(0,21) <sup>a</sup>	16,45(6,36) <sup>c</sup>	0,83(0,53) <sup>b</sup>	12,48(5,77) <sup>b</sup>	1,27(0,90) <sup>b</sup>	19,21(9,78) <sup>b</sup>	0,27(0,22) <sup>b</sup>	8,53(5,65) <sup>b</sup>
	S	0,12(0,13)	6,11(4,30)	0,24(0,27)	5,08(2,70)	0,25(0,24)	6,63(3,48)	0,04(0,07)	1,31(1,62)
F56	E	0,12(0,08) <sup>c</sup>	8,23(8,19) <sup>b</sup>	0,35(0,19) <sup>c</sup>	13,76(6,74) <sup>c</sup>	0,44(0,30) <sup>c</sup>	9,90(5,66) <sup>c</sup>	0,08(0,09) <sup>a</sup>	2,34(2,60) <sup>b</sup>
	S	0,01(0,01)	1,26(1,89)	0,06(0,08)	3,49(4,71)	0,03(0,04)	0,86(1,27)	0,01(0,02)	0,20(0,42)
F60	E	0,02(0,04)	0,91(1,81)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,04)	0,13(0,46)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
	S	0,01(0,03)	0,75(1,83)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,02)	0,22(0,76)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F61	E	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,05(0,08)	0,70(0,93)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
	S	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,04)	0,35(0,89)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F66	E	0,03(0,03)	0,94(1,16)	0,02(0,03)	0,25(0,46)	0,03(0,03)	0,28(0,38)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
	S	0,01(0,02)	0,44(0,55)	0,01(0,02)	0,23(0,39)	0,00(0,01)	0,09(0,31)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F67	E	0,01(0,02)	0,29(0,60)	0,02(0,04)	0,24(0,76)	0,02(0,04)	0,28(0,63)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
	S	0,01(0,02)	0,49(1,19)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,02)	0,03(0,10)	0,00(0,00)	0,00(0,00)
F68	E	0,14(0,10)	3,25(2,10)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,32(0,46) <sup>b</sup>	2,15(3,30) <sup>a</sup>	0,31(0,25)	5,51(3,72)
	S	0,22(0,25)	7,60(7,86)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,30(0,52)	6,17(6,98)
F69	E	1,40(0,64)	57,42(19,41) <sup>c</sup>	2,99(1,87)	38,58(24,41) <sup>c</sup>	1,84(1,06)	30,13(15,60) <sup>b</sup>	1,01(0,87)	28,85(19,59)
	S	1,84(0,75)	134,35(43,56)	4,58(3,36)	96,89(39,41)	2,90(2,39)	76,06(45,62)	1,46(2,06)	45,32(42,72)
F70	E	1,21(0,85)	40,90(27,56) <sup>b</sup>	2,13(1,74)	26,87(22,66) <sup>b</sup>	1,35(0,99)	18,20(14,45) <sup>a</sup>	0,81(0,71)	20,77(15,40)
	S	1,63(1,16)	109,64(70,10)	3,43(3,37)	66,28(40,97)	2,18(2,55)	52,88(50,45)	1,34(2,19)	39,27(46,33)
F71	E	0,03(0,04)	1,22(1,66)	0,06(0,05) <sup>b</sup>	0,54(0,67) <sup>a</sup>	0,09(0,08)	0,99(0,83)	0,17(0,07) <sup>b</sup>	4,01(2,52) <sup>b</sup>
	S	0,36(1,21)	16,74(56,70)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,03(0,06)	0,67(1,56)	0,04(0,09)	1,09(2,63)
F72	E	0,02(0,03)	0,66(1,17)	0,02(0,03)	0,40(0,93)	0,04(0,05)	0,47(0,58)	0,03(0,05)	0,70(1,39)
	S	0,01(0,02)	1,05(1,95)	0,00(0,00)	0,00(0,00)	0,01(0,04)	0,61(2,04)	0,00(0,00)	0,00(0,00)

Se observaron diferentes patrones de secreción con respecto al tiempo, como muestra la Figura 14A. Cuando se analizó con respecto a la CR, se hallaron tres patrones de secreción:

- La banda nombrada como F54 disminuye tras 6 horas en cultivo, aumenta a 24 horas y cae de nuevo a 48 horas.
- La banda F56 aumenta a 6 horas y disminuye hasta 48 horas.
- Un ejemplo del último patrón es el de la banda F69 cuya secreción cae a medida que pasa el tiempo.

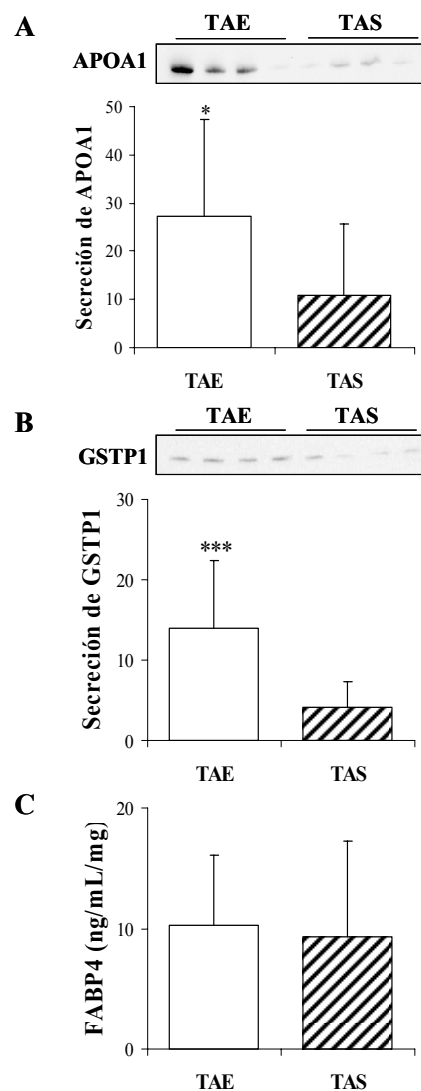
Sin embargo, tras analizar las diferencias con respecto a PDO se encontraron dos patrones de secreción:

- Con este análisis, las bandas F54 y F56 siguen el mismo patrón de secreción. Ambas incrementan su intensidad hasta las 24 horas y disminuyen a 48 horas.
- El otro patrón es el de la banda F69 que aumenta tras 6 horas de cultivo y desciende progresivamente hasta las 48 horas.

**Secreción de APOA1, FABP4 y GSTP1**

Para medir los cambios de las proteínas secretadas por el TAE y el TAS, se eligieron tres proteínas con diferentes patrones de secreción tras el análisis relativo a la cantidad total de la línea (F54, F56 y F69). Así, las bandas F54 y F56, que corresponden a APOA1 y GSTP1 respectivamente, fueron comprobadas mediante western blot con anticuerpos específicos. Se encontró que el TAE secreta más APOA1 ( $27,26 \pm 20,00$  frente a  $10,92 \pm 14,74$ ,  $n=16$ ;  $p=0,013$ ) y GSTP1 ( $14,04 \pm 8,34$  frente a  $4,14 \pm 3,17$ ,  $n=16$ ;  $p=3,43 \times 10^{-4}$ ) que el TAS de manera estadísticamente significativa (Figura 15A y 15B).

Sin embargo, no se pudo demostrar mediante EIA una diferencia por parte de ambos tejidos ( $10,25 \pm 5,79$  frente a  $9,30 \pm 7,90$ ,  $n=16$ ;  $p=0,663$  en TAE y TAS, respectivamente) en la secreción de FABP4 (que se corresponde con la banda F69) como se había observado en el análisis de 1DE (Figura 15C). Esta proteína era la que presentaba un patrón de secreción más diferente.

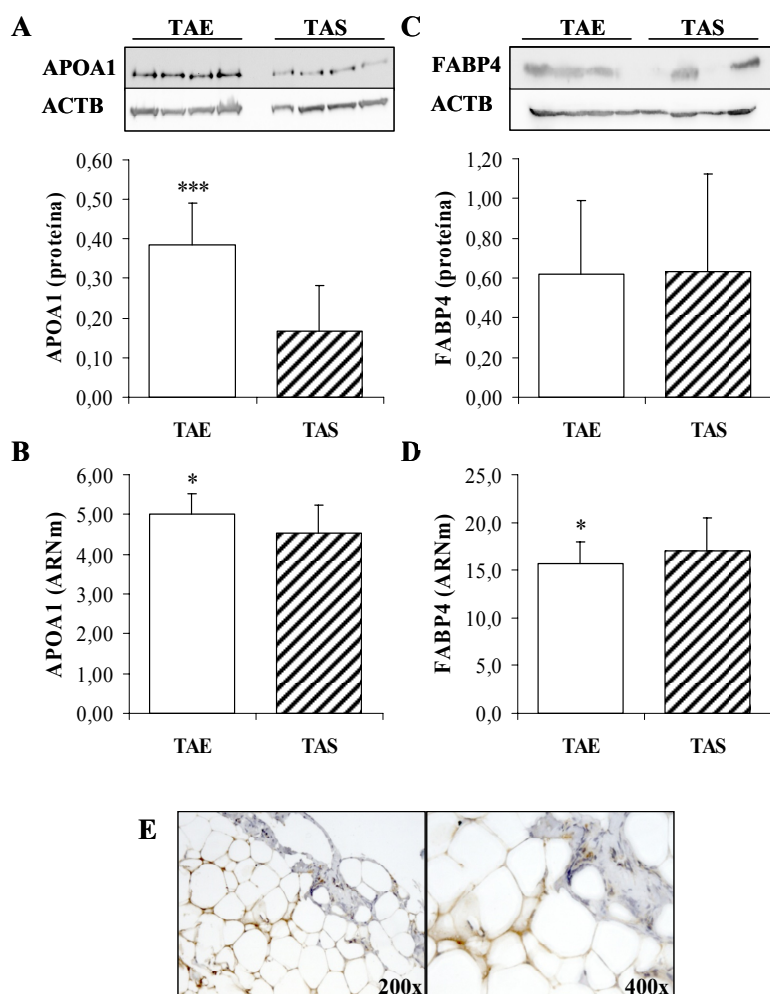


**Figura 15.** Imagen de western blot y gráfica representando los valores de densitometría en unidades arbitrarias para la secreción de APOA1 (A) y GSTP1 (B). C. Gráfica de la secreción de FABP4 en ng/mL/mg. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n=16$ .

**Expresión de proteína y de ARNm para APOA1, FABP4 y GSTP1**

Se trató de averiguar si los niveles de expresión de proteína y ARNm para APOA1 y FABP4 eran diferentes para ambos tejidos, TAE y TAS. El análisis de western blot mostró que los niveles de proteína de APOA1 eran mayores en el TAE que en el TAS de manera estadísticamente significativa ( $0,38 \pm 0,11$  frente a  $0,17 \pm 0,11$ ;

$p=2,63 \times 10^{-7}$ ,  $n=23$ ) (Figura 16A). De igual modo los niveles de ARNm para APOA1 fueron mayores en el TAE ( $5,02 \pm 0,52$  frente a  $4,55 \pm 0,67$ ,  $n=17$ ;  $p=0,017$ ) (Figura 16B).



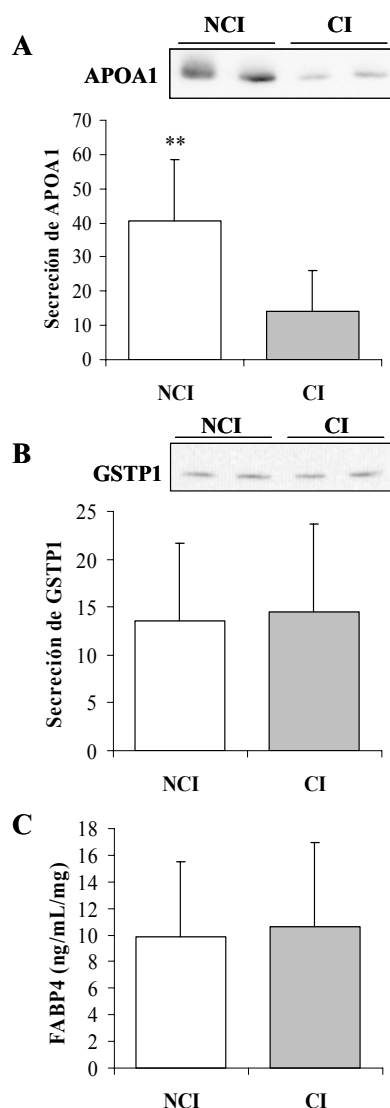
**Figura 16.** Análisis de western blot y gráfica de su densitometría para APOA1 (A) y FABP4 (C) o expresión génica para APOA1 (B) o FABP4 (D) normalizados con respecto a ACTB y representados como unidades arbitrarias. \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$ ;  $n=23$  (proteína) o  $n=32$  (ARNm). E. Inmunohistoquímica para APOA1 sobre TAE.

Aunque los niveles de proteína para FABP4 fueron similares para los dos tejidos ( $0,62 \pm 0,37$  frente a  $0,63 \pm 0,49$ ;  $p=0,929$ ,  $n=23$ ) (Figura 16C), su expresión a nivel de ARNm fueron menores en el TAE que en el TAS ( $15,66 \pm 2,34$  frente a  $17,05 \pm 3,41$ ;  $p=0,033$ ,  $n=32$ ) (Figura 16D).

Los análisis para GSTP1 no se llevaron a cabo puesto que se habían determinado previamente como se muestra en el capítulo tres. La Figura 16E muestra la



tinción para APOA1 realizada mediante inmunohistoquímica, con la que se determinó su expresión mayoritariamente en los adipocitos.



**Figura 17.** Imagen de western blot y gráfica representando los valores de densitometría en unidades arbitrarias para la secreción de TAE para APOA1 (A) y GSTP1 (B). Gráfica de la secreción de TAE para FABP4 en ng/mL/mg. \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 16$  entre CI y NCI.

#### **Relación entre la secreción de APOA1, GSTP1 y FABP4 y la cardiopatía isquémica**

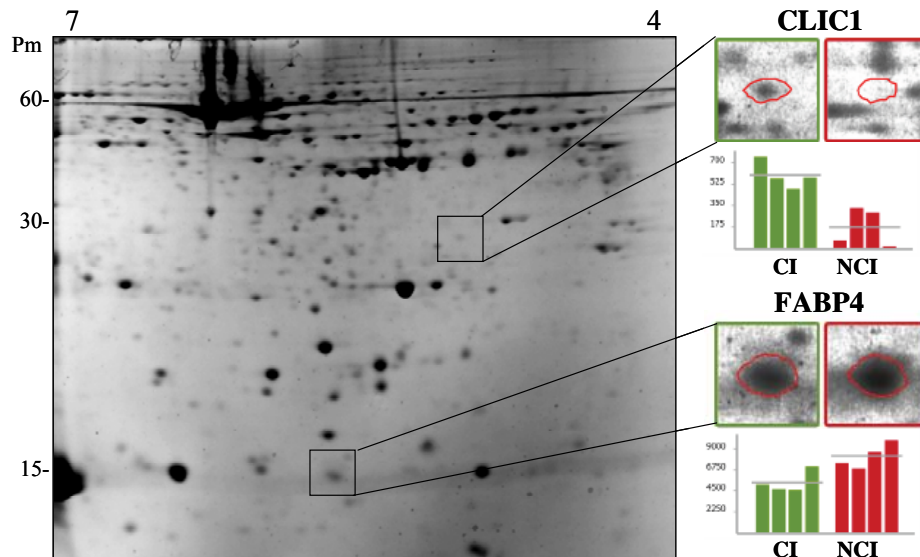
Se ha descrito que el TAE libera al medio de cultivo niveles mayores de APOA1 y GSTP1. Sin embargo, se decidió comprobar la secreción de estas proteínas en TAE de pacientes sin/con cardiopatía isquémica ya que este tejido podría jugar un papel paracrino debido a su localización alrededor de las coronarias sin barreras anatómicas.

Así, se encontró que el TAE de pacientes con CI secreta al medio de cultivo niveles de APOA1 menores que los pacientes NCI ( $14,03 \pm 11,67$  frente a  $40,49 \pm 17,92$ ,  $n = 16$ ,  $p = 0,004$ ; Figura 17A). Sin embargo, los niveles de secreción de GSTP1 y FABP4 son similares en CI y NCI (Figure 17B,C).

#### **Análisis bi-dimensional relativo a la CI**

Se realizaron geles de 2DE de tejido adiposo epicárdico de 8 pacientes sometidos a cirugía cardíaca (cuatro pacientes con CI y cuatro sin CI) para analizar sus diferencias proteómicas. Las características clínicas entre ambos grupos eran similares, excepto la diferencia principal que suponía la presencia de enfermedad coronaria.

De las 312 manchas totales de cada gel, el análisis entre los dos grupos localizó diferencias estadísticamente significativas en dos manchas. Estas dos manchas estaban presentes en todos los geles incluidos en el análisis y se identificaron, con una puntuación de 512 o 484, como CLIC1 y FABP4, respectivamente. La mancha identificada como CLIC1 tenía una intensidad mayor en el TAE de individuos con CI (coeficiente de incremento=3,46) mientras que la identificada como FABP4 mostraba menor intensidad en este grupo (coeficiente de incremento=1,53; Figura 18).



**Figura 18.** Imagen representativa de un gel 2DE. Las gráficas representan la intensidad para CLIC1 o FABP4 en CI o NCI de cada paciente.

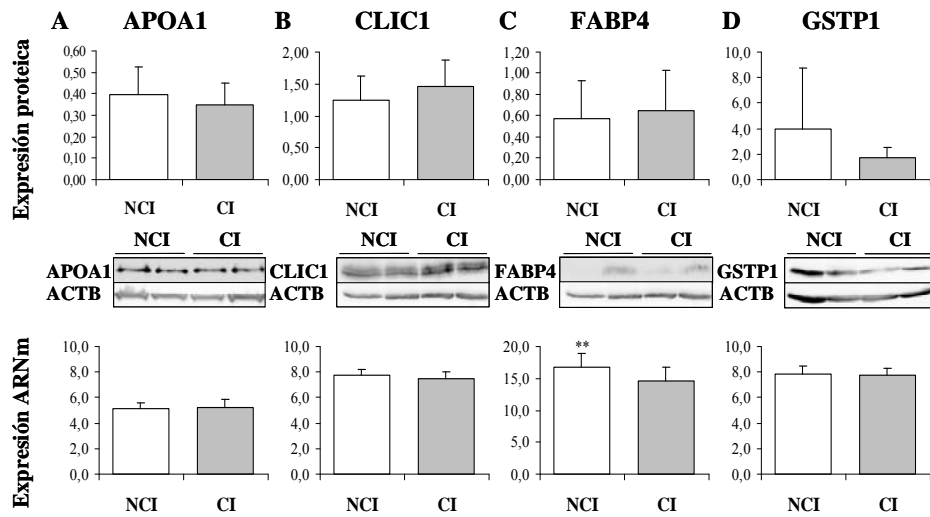
#### **Estudio de ARNm y proteína entre muestras CI/NCI**

Para tratar de corroborar los hallazgos de la 2DE, se ha realizado un análisis por western blot usando anticuerpos frente a CLIC1, FABP4 y también APOA1 y GSTP1 (dado que su secreción es distinta entre el TAE y el TAS). Sin embargo, por medio de esta técnica no se pudieron comprobar las diferencias de estas proteínas con respecto a la CI. Así, CLIC1 ( $1,24 \pm 0,38$  frente a  $1,46 \pm 0,42$ ,  $n=24$ ) y, sorprendentemente FABP4 ( $0,58 \pm 0,35$  frente a  $0,65 \pm 0,38$ ,  $n=24$ ) fueron similares en pacientes sin/con CI.

Tampoco fueron diferentes entre ambos grupos ni los niveles de APOA1 ( $0,40 \pm 0,13$  frente a  $0,35 \pm 0,10$ ,  $n=24$ ) ni los de GSTP1 ( $4,00 \pm 4,76$  frente a  $1,68 \pm 0,87$ ,  $n=24$ ; Paneles superiores de la Figura 19, A-D). De este modo, los resultados correspondientes a CLIC1 y FABP4 no validaban los cambios proteicos observados en

el análisis de 2DE. En algunas ocasiones la estrategia de validación mediante western blot-1DE está limitada porque: a) los anticuerpos comerciales no reconocen específicamente la proteína estudiada, b) las proteínas separadas por 1DE están mezcladas y el epítipo puede estar “escondido”.

Por ello, se ha decidido analizar la expresión del ARNm. Aunque los niveles de proteína y ARNm no tienen por qué ser iguales, la PCR en tiempo real es una técnica más precisa y cuantitativa. Los resultados han mostrado que APOA1 ( $5,13 \pm 0,47$  frente a  $5,20 \pm 0,69$ ,  $n=23$ ), CLIC1 ( $7,74 \pm 0,45$  frente a  $7,47 \pm 0,57$ ,  $n=29$ ) y GSTP1 ( $7,86 \pm 0,62$  frente a  $7,72 \pm 0,57$ ,  $n=24$ ) presentan niveles de expresión génica similares entre grupos. Sin embargo, se han obtenido resultados similares a los del análisis 2DE para los niveles de ARNm de FABP4. En consecuencia, el TAE expresa niveles de FABP4 mayores en el grupo de NCI comparado con el de CI ( $16,79 \pm 2,17$  frente a  $14,67 \pm 2,07$ ,  $n=32$ ;  $p=0,008$ ; Paneles inferiores de la Figura 19, A-D).



### **Discusión del capítulo cuatro**

En el desarrollo de esta tesis, se ha descrito el primer estudio proteómico sobre el secretoma de TAE y su comparación con TAS y con CI. Uno de los principales hallazgos fue que el TAE tiene una capacidad secretora más alta que el TAS. Villaret y colaboradores comunicaron que el tejido adiposo visceral mostraba mayor densidad vascular que el TAS [Villaret, Galitzky, *et al.* 2010]. Esto podría explicar la actividad secretora del TAE. Aunque se identificaron las proteínas secretadas por el TAE mediante espectrometría de masas, solamente fue verificada la secreción de APOA1, FABP4 y GSTP1 mediante varias técnicas. Así, los resultados obtenidos mostraron que el TAE libera al medio de cultivo más APOA1 y GSTP1 que el TAS. Además, los niveles de APOA1 en TAE disminuyen en pacientes con CI. Con respecto a la secreción de FABP4 no se pudieron validar los resultados del análisis secretómico. Sin embargo, el análisis proteómico de TAE entre CI y NCI permitió hallar niveles más bajos de esta proteína también en pacientes con CI.

Los nuevos hallazgos y estudios sobre tejido adiposo han evidenciado que éste es más que un reservorio pasivo para el almacenaje de energía, dado que expresa y secreta una variedad de adipoquinas. La producción y secreción de estos péptidos depende de su localización. Así, el tejido adiposo visceral es metabólicamente más activo y está más correlacionado con la patogénesis del síndrome metabólico que el TAS [Fain, Madan, *et al.* 2004, Giorgino, Laviola, *et al.* 2005, Park y Lee 2005, Fox, Massaro, *et al.* 2007]. El TAE es una grasa visceral adyacente a las arterias coronarias y al miocardio [Iacobellis, Corradi, *et al.* 2005] que podría estar jugando un papel en las patologías coronarias. En los últimos años, se realizaron varios estudios sobre la expresión de adipoquinas en TAE y la comparación con otros depósitos de grasa [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Fain, Sacks, *et al.* 2010, Spiroglou, C, *et al.* 2010]. Sin embargo, esta es la primera vez que se analiza el secretoma del TAE comparándolo con el TAS en pacientes con y sin CI.

Se desarrollaron varios protocolos para la evaluación de las proteínas secretadas derivadas del tejido adiposo. Así, Alvarez-Llamas y colaboradores han aplicado un marcaje de aminoácidos con isótopos estables en cultivo celular (SILAC) seguido por aproximaciones 1D SDS-PAGE y LC-MS/MS. Aunque fueron identificadas 259 proteínas, sólo 108 contenían el péptido señal, predicho por SignalP, y eran secretadas. Además, de estas 108, 70 eran proteínas sintetizadas *de novo*. A pesar

de la aplicación de esta tecnología avanzada, identificaron muchas proteínas séricas e intracelulares [Alvarez-Llamas, Szalowska, *et al.* 2007]. Hocking y colaboradores han usado cromatografía de afinidad con lectinas (LAC) seguido de una comparación de tasas de incorporación de aminoácidos marcados con un isótopo (CILAIR) para cuantificar las diferencias relativas en los secretomas de explantes de tejido adiposo visceral y subcutáneo. En ese estudio hallaron mayoritariamente proteínas de la matriz extracelular, haptoglobina, SPARC, receptor del factor de crecimiento epidérmico, etc. [Hocking, Wu, *et al.* 2010]. De nuevo, otro estudio del secretoma de tejido adiposo mediante CILAIR ha detectado proteínas como por ejemplo varias cadenas de colágeno, factores del complemento, proteínas implicadas en la matriz extracelular, SPARC [Roelofsen, Dijkstra, *et al.* 2009], etc.

En el presente trabajo, se estudiaron los patrones de secreción de ambos tejidos adiposos (epicárdico y subcutáneo). Para ello, se recogió el medio de cultivo de los explantes a varios tiempos (3, 6, 24 y 48 horas), reemplazándolo por medio nuevo, para estudiar el patrón de secreción de cada proteína. En este estudio, se observó una capacidad secretora global más elevada en TAE que en TAS. Las diferencias entre TAE y TAS en cuanto a secreción de proteína fueron analizadas usando el programa informático Quantity One. Así, se decidió analizar la intensidad de las bandas (proteínas) de dos maneras distintas a) comprobando el pico de densidad óptica (PDO) de cada banda b) relativizar el pico de densidad óptica con respecto a la intensidad total de las bandas (CR). Este último método tiene en cuenta la cantidad total de proteína secretada. De este modo se han encontrado dos o tres perfiles de secreción dependiendo del método de análisis utilizado. Las bandas F28, F30, F31, F54 y F56 corresponden a albúmina, glucosa-6-fosfato isomerasa,  $\alpha$ -1-antitripsina, apolipoproteína A-I (APOA1) y Glutación S-transferasa P (GSTP1) y presentaron cambios estadísticamente significativos entre ambos tejidos independientemente del método de análisis utilizado. Sin embargo, la diferencia entre TAE y TAS de FABP4, que se corresponde con la banda F69, sólo fue observada cuando se realizaba el análisis con el método de CR. De hecho, la pérdida de diferencia entre TAE y TAS para esta proteína observada con el método de análisis de PDO podría explicar que el resultado obtenido en el análisis secretómico no se halla podido verificar mediante otras técnicas.

APOA1, una proteína de 28 kDa, es el componente principal del HDL y es un marcador robusto de enfermedad cardiovascular y mortalidad en hombres ancianos

[Florvall, Basu, *et al.* 2006]. En ratones transgénicos se ha demostrado que la expresión génica de APOA1 aumenta los niveles de HDL [Walsh, Ito, *et al.* 1989]. Además, existen varias hipótesis para explicar el papel protector de HDL frente a la aterosclerosis: 1) El flujo de colesterol hacia el exterior de las células espumosas, 2) los efectos sobre la expresión de moléculas de adhesión en la pared vascular, o 3) la inhibición de la oxidación del LDL [Santos-Gallego, Ibanez, *et al.* 2008].

Los datos obtenidos en este trabajo sobre la secreción del TAE se vuelven especialmente importantes cuando se analiza la influencia de la cardiopatía isquémica. Se han encontrado diferencias significativas que muestran que la liberación de APOA1 es mayor en TAE en el grupo de pacientes NCI que en el de CI. Trabajos recientes han mostrado que el TAE es una fuente de mediadores inflamatorios y exhibe una peculiarmente alta infiltración de macrófagos en pacientes con CI [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Baker, Silva, *et al.* 2006]. Conjuntamente, Dimayuga y colaboradores demostraron que el HDL reconstituido conteniendo APOA1 disminuía la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento celular en arterias dañadas de ratones hiperlipidémicos [Dimayuga, Zhu, *et al.* 1999]. La menor secreción de APOA1 en TAE del subgrupo de pacientes con CI podría estar contribuyendo en el desarrollo de la misma.

En el capítulo anterior se había observado que el TAE mostraba un mayor estrés oxidativo y niveles elevados de proteínas implicadas en este proceso, como GSTP1, cuando se lo comparaba con el TAS. Ahora, se descubrió una mayor secreción de GSTP1 del mismo modo. Generalmente, se asume que la liberación de proteínas citoplasmáticas se debe a una lisis celular, aunque no pueden ser descartados otros mecanismos de excreción [Nickel y Seedorf 2008, Prudovsky, Tarantini, *et al.* 2008]. Así Keller y colaboradores han identificado previamente que GSTP1 era secretado por queratinocitos [Keller, Ruegg, *et al.* 2008]. Además, cabe destacar que muchos factores de riesgo contribuyen a la progresión de la enfermedad cardiovascular vía estrés oxidativo, al menos en parte [Fearon y Faux 2009]. La presencia de GSTP1 en el medio de cultivo podría ser una consecuencia de la respuesta del TAE, bien a los niveles oxidativos intra-tisulares elevados observados en este depósito graso (ver capítulo anterior), o bien al estrés oxidativo del ambiente en el que se encuentra TAE o bien a ambos.

Las proteínas de unión a ácidos grasos son proteínas citoplasmáticas de pequeño tamaño que se unen de manera reversible y con alta afinidad a ligandos hidrofóbicos, como ácidos grasos de cadena larga. Existen al menos nueve miembros identificados, de los cuales el predominante en adipocitos es FABP4. Furuhashi y colaboradores han demostrado en modelos de ratón que un inhibidor oral de FABP4 resultaba un agente terapéutico efectivo contra la aterosclerosis severa [Furuhashi, Tuncman, *et al.* 2007]. También se sabe que la carencia de FABP4 protege contra la aterosclerosis en modelos de ratón [Makowski, Boord, *et al.* 2001, Boord, Maeda, *et al.* 2002, Boord, Maeda, *et al.* 2004]. Recientemente, se demostró que FABP4 es liberado al torrente sanguíneo y está relacionado con obesidad y síndrome metabólico [Xu, Wang, *et al.* 2006].

Todos estos hallazgos hacen de FABP4 un buen candidato a explorar en relación con la enfermedad cardiovascular. Estudios previos mostraron que los niveles séricos de FABP4 son más altos en mujeres que en hombres [Xu, Wang, *et al.* 2006, Rhee, Lee, *et al.* 2009, Bagheri, Qasim, *et al.* 2010, Jin, Peng, *et al.* 2010], tendencia que también se observó en este estudio en cuanto al contenido proteico y la secreción de las muestras recogidas; aunque estas diferencias no han alcanzado la significatividad estadística. Fain y colaboradores encontraron recientemente niveles de expresión de ARNm más bajos en TAE comparado con otros depósitos de grasa [Fain, Sacks, *et al.* 2010], y estos datos han sido confirmados en el presente estudio.

En relación a la CI, los niveles séricos de FABP4 tienden a estar elevados en relación a los pacientes control y se incrementan a medida que aumentan el número de arterias coronarias afectadas [Rhee, Lee, *et al.* 2009, Jin, Peng, *et al.* 2010]. Además, las diferencias en cuanto a los niveles séricos de FABP4 parecen ser mayores en mujeres [Jin, Peng, *et al.* 2010]. En este estudio, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las muestras de TAE en cuanto a la expresión de ARNm y proteína de FABP4 entre pacientes NCI y CI, donde el grupo de pacientes NCI presentaba niveles de FABP4 más altos. Nuestro grupo y Chatterjee y colaboradores han descrito que el tamaño del adipocito del TAE es menor que el del TAS y que la respuesta inflamatoria está inversamente relacionada con el tamaño del adipocito [Chatterjee, Stoll, *et al.* 2009, Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2010]. Quizás, el distinto estado de diferenciación de los adipocitos en ambos tejidos podría estar influenciado por la enfermedad coronaria o

el estado inflamatorio y disminuir las principales adipoquinas como adiponectina [Iacobellis, Pistilli, *et al.* 2005, Teijeira-Fernandez, Eiras, *et al.* 2008], FABP4 y otras.

En conclusión, este trabajo pone de manifiesto que el TAE presenta una mayor actividad secretora que el tejido subcutáneo. Una de estas proteínas secretadas es APOA1 cuyos niveles son menores en CI. Así, la menor expresión de FABP4 y la menor secreción de APOA1 en TAE de los pacientes con CI están indicando que las funciones de transporte de lípidos en este tejido podrían estar jugando un papel importante sobre el desarrollo de la enfermedad coronaria. Estos resultados sugieren que APOA1 podría ser utilizada como una diana terapéutica local para prevenir la progresión de la cardiopatía isquémica.



# CAPÍTULO CINCO

## METODOLOGÍA Y RESULTADOS III

“La cardiopatía isquémica está asociada a niveles más altos de RBP4 epicárdico y niveles más bajos de GLUT4 en tejido adiposo epicárdico y subcutáneo”

*“Coronary artery disease is associated to higher epicardial RBP4 and lower GLUT4 levels in epicardial and subcutaneous adipose tissue”*



## CAPÍTULO CINCO: METODOLOGÍA Y RESULTADOS III

### Introducción al capítulo cinco

La cardiopatía isquémica (CI) es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. La obesidad, la resistencia a insulina y la hipercolesterolemia fueron identificados como los principales factores de riesgo de la cardiopatía isquémica [Mathieu, Poirier, *et al.* 2009].

La secreción de moléculas por parte de los adipocitos, denominadas adipocinas, también ha sido asociada a estos factores y las enfermedades cardiovasculares [Berg y Scherer 2005, Goralski y Sinal 2007, Gonzalez-Juanatey, Paz, *et al.* 2009]. En esta línea, la proteína de unión al retinol 4 (RBP4), que es la proteína encargada del transporte de retinol en la circulación, ha sido reconocida como una adipocina en los '90 [Tsutsumi, Okuno, *et al.* 1992] y se ha revelado recientemente como un inductor de resistencia a insulina en ratones [Yang, Graham, *et al.* 2005].

Estudios previos han evidenciado que el RBP4 circulante proviene de varias fuentes; como el hígado [D'Onofrio, Colantuoni, *et al.* 1985], los macrófagos [Broch, Ramirez, *et al.* 2009] y también el tejido adiposo [Yang, Graham, *et al.* 2005]. Sin embargo, cuáles de los depósitos de grasa contribuyen a los niveles finales en plasma no está claro todavía [Stefan, Hennige, *et al.* 2007]. Se han realizado estudios de los niveles séricos de RBP4 o de su expresión de ARNm en tejido adiposo con el objetivo de dilucidar su relación con varios factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, mientras que varias observaciones apoyaban asociaciones con obesidad, resistencia a insulina y *diabetes mellitus* tipo II [Yang, Graham, *et al.* 2005, Graham, Yang, *et al.* 2006, Jia, Wu, *et al.* 2007, Kloting, Graham, *et al.* 2007, Stefan, Hennige, *et al.* 2007, Lee, Im, *et al.* 2009], otros grupos no eran capaces de confirmarlo [von Eynatten, Lepper, *et al.* 2007, Yao-Borengasser, Varma, *et al.* 2007].

Trabajos recientes han sugerido un papel de RBP4 en el síndrome metabólico, hipertensión [Solini, Santini, *et al.* 2009] o dislipemia [Makino, Fujiwara, *et al.* 2009]. Más específicamente, se ha encontrado que RBP4 estaba relacionado con el metabolismo lipídico y la enfermedad cardiovascular [Graham, Yang, *et al.* 2006, Lee, Im, *et al.* 2007, Ingelsson, Sundstrom, *et al.* 2009, Lee, Im, *et al.* 2009]. De acuerdo con esto, los niveles excesivos de triglicéridos se correlacionan con el tejido adiposo visceral (TAV) [Rissanen, Hudson, *et al.* 1994] y los niveles de RBP4 en suero también

están asociados con la acumulación de triglicéridos en TAV [Lee, Im, *et al.* 2007] así como en otras localizaciones, por ejemplo en el hígado [Stefan, Hennige, *et al.* 2007].

El TAE es un depósito de TAV especial que se encuentra en las cavidades atrio-ventricular e inter-ventricular y a lo largo de las ramas principales de las arterias coronarias [Sacks y Fain 2007]. La acumulación de tejido adiposo en el corazón y la ausencia de barreras anatómicas entre el TAE y los vasos sanguíneos sugiere un posible papel en la fisiopatología de la CI [Chaowalit, Somers, *et al.* 2007]. Así, en pacientes con CI ha sido demostrado que el TAE presenta niveles de adipoquinas inflamatorias más elevados que el TAS [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003] y la disminución regulada de proteínas anti-inflamatorias como la adiponectina [Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008]. En este sentido, el comportamiento de TAE y TAS parece ser diferente con respecto a los patrones de expresión de adipoquinas pro-inflamatorias [Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008, Teijeira-Fernandez, Eiras, *et al.* 2008].

Por ello, si el TAE está cerca de las coronarias y RBP4 —principalmente producido por los adipocitos— está relacionado con el metabolismo lipídico y la resistencia a insulina (que son los principales factores de riesgo de la CI); se ha propuesto que investigar la expresión/secreción de RBP4 en TAE y TAS y su asociación con la CI podría ayudar a entender el papel del TAE en esta situación.

**Metodología III****Pacientes**

Se recogieron biopsias de 58 pacientes sometidos a cirugía cardíaca (reemplazo valvular, revascularización coronaria o ambas). Los criterios de exclusión fueron cirugía cardíaca previa y/o enfermedades infecciosas graves. Todos los participantes habían dado su consentimiento informado por escrito. El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el Comité de Investigación Clínica de Galicia (comité ético local) y llevado a cabo según la Declaración de Helsinki. Las características clínicas aparecen resumidas en la Tabla 5. Los perfiles glucídico y lipídico fueron obtenidos una semana antes de la cirugía. El grupo de CI fue definido como presencia de al menos una coronaria afectada con una estenosis del diámetro de su lumen  $\geq 50\%$  medido por angiograma coronario. La obtención, transporte y almacenamiento de las muestras se realizaron como se ha descrito previamente en el capítulo tres.

**Tabla 5.** Características clínicas de los pacientes utilizados en cada ensayo del capítulo. HTA: hipertensión; DMT2: *diabetes mellitus* tipo II; HLP: hiperlipidemia; IMC: índice de masa corporal; TGs: triglicéridos; COL: colesterol total; GLUC: glucosa. IECAs/ARBs: inhibidores del enzima convertidor de angiotensina/bloqueantes del receptor de angiotensina.

	RT-PCR (37)			WB (23)			EIA (18)		
	NCI (19)	CI (18)	<i>p</i>	NCI (13)	CI (10)	<i>p</i>	NCI (10)	CI (8)	<i>p</i>
<b>Demográficos</b>									
Edad	72±1,5	68±1,9	0,091	72±2,4	74±2,5	0,584	72±1,8	68±3,9	0,301
Sexo □ (n)	10	13	0,076	5	6	0,305	6	6	0,502
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29±1	30±0,7	0,397	28±1,3	29±1,4	0,504	31±0,7	29±1,9	0,368
HTA (n)	15	14	0,504	10	9	0,412	8	7	0,671
DMT2 (n)	6	7	0,458	1	2	0,385	4	2	0,502
HLP (n)	12	12	0,452	5	6	0,305	5	5	0,596
<b>Tratamientos</b>									
IECAs/ARBs (n)	10	11	0,332	4	3	0,968	7	4	0,387
Estatinas (n)	9	9	0,600	3	5	0,179	4	3	0,914
Beta-bloqueantes (n)	4	7	0,150	1	4	0,063	3	4	0,387
Bloq. canales Ca <sup>+2</sup> (n)	4	6	0,329	2	5	0,074	2	4	0,180
<b>Análisis laboratorio</b>									
TGs (mg/dL)	120 ± 12	165± 16	<b>0,036</b>	111± 8,3	124± 18	0,504	128 ± 10	172 ± 24	0,124
COL(mg/dL)	180 ± 7,9	174± 9,6	0,634	211 ± 9,7	138± 6,6	<b>&lt;0,001</b>	184 ± 8,6	185± 10	0,912
GLUC (mg/dL)	108 ± 5,2	119± 10	0,347	102 ±4,2	119 ± 12	0,215	106 ± 9,7	110 ± 7,1	0,752
TAE RBP4	10,4±0,2	9,95±0,3	0,283	0,41±0,04	0,63±0,09	<b>0,039</b>	12,80±2,6	10,2±2,6	0,491
TAS RBP4	10,6±0,3	9,7±0,3	0,084	0,47±0,14	0,64±0,20	0,499	3,59±0,7	2,70±0,4	0,267

### ***PCR en tiempo real***

El proceso de retrotranscripción y amplificación para el análisis comparativo de expresión de ARNm se ha llevado a cabo tal y como se ha descrito en la metodología del capítulo tres. Los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación se describen en el la tabla del Anexo 1. Se comprobaron las curvas de disociación y los valores en unidades arbitrarias se obtuvieron usando el anti-logaritmo de la fórmula  $Ct_1(ACTB)/Ct_2(RBP4)$ .

### ***Análisis por western blot***

Las proteínas de ambos tipos de grasas fueron separadas en geles de poli-acrilamida al 13% y transferidas a membranas de PVDF como se ha descrito en el capítulo tres. Se usaron anticuerpos monoclonales de ratón (Santa Cruz Biotechnology) para la detección de RBP4 o ACTB, diluidos 1:1000 en solución de bloqueo. La densitometría obtenida con el programa informático Image J se utilizó para cuantificar los niveles de RBP4, evaluados por duplicado y expresados con respecto a los niveles de ACTB.

### ***Inmunohistoquímica***

El TAE y el TAS fueron fijados en formol, embebidos en parafina y cortados en secciones de 4µm de grosor. Una vez desparafinadas, las muestras fueron pretratadas como se ha descrito anteriormente para desenmascarar el antígeno. Los cortes histológicos fueron expuestos a una dilución 1:5 de anticuerpo anti-RBP4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) durante toda la noche y el revelado se llevó a cabo de manera similar a lo realizado en el capítulo tres.

### ***Explantos de tejido adiposo***

Los explantes de tejido adiposo fueron transportados desde el quirófano hasta el laboratorio en PSS y cultivados como se describe en el capítulo anterior. Los medios de cultivo y las muestras de tejido fueron almacenadas a -40°C hasta su uso.

### ***Inmunoensayo enzimático (EIA)***

El medio de cultivo de los explantes se concentró de 500µL a 50µL usando el sistema de columnas Amicon Ultra 0,5mL 3K (Millipore Carrigtwohill, Co. Cork,

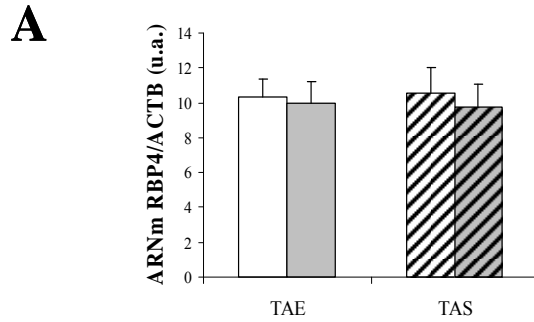
Ireland). En el plato de ensayo se cargaron 10 $\mu$ L de muestra por duplicado. La concentración de proteína para RBP4 fue medida con un kit de EIA (Phoenix Europe GMBH, Karlsruhe, Germany) con un límite de sensibilidad mínimo de 2,05ng/mL.

#### ***Análisis estadístico***

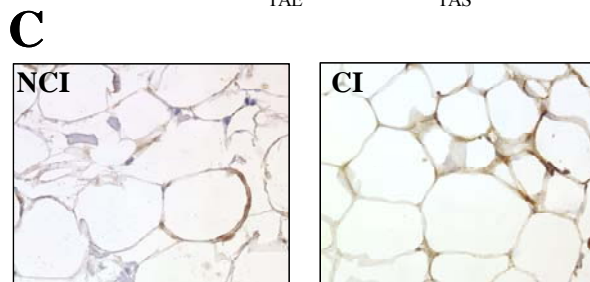
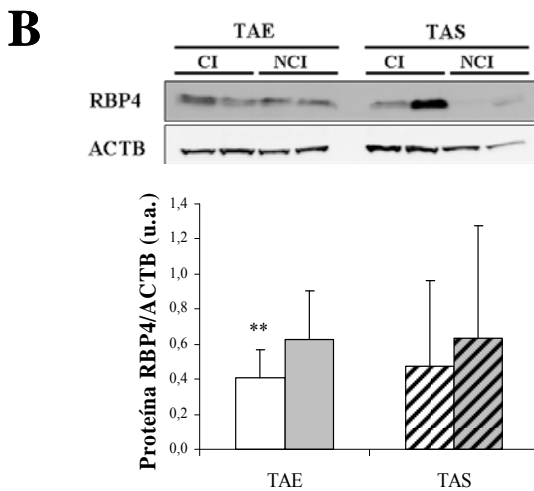
Los resultados se muestran como media $\pm$ desviación estándar. La normalidad de las variables continuas fue comprobada con el test de Kolmogorov-Smirnof. Las diferencias entre el TAE y el TAS fueron analizadas con un test *t* de Student para muestras pareadas mientras que para las comparaciones entre CI y NCI se realizó un test *t* de Student. La significatividad estadística ha sido definida como  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el programa informático SSPS 15.0 para Windows.

**Resultados III****RBP4 en muestras de TAE y TAS**

La expresión de ARNm fue estudiada en TAE y TAS de 37 pacientes clasificados según la presencia/ausencia de cardiopatía isquémica (CI/NCI). Como muestra la Figura 20A, la expresión de ARNm de RBP4 se normalizó con respecto a ACTB y se representa como unidades arbitrarias (u.a.).



**Figura 20. A.** Análisis de RT-PCR de 37 pacientes con (barras grises) o sin CI (barras blancas) representados como u.a. con respecto a ACTB. **B.** El panel superior muestra una imagen representativa de western blot para TAE y TAS con/sin CI. La gráfica representa la medida de densitometría para 23 pacientes como u.a.  $**p<0,01$  entre CI y NCI en TAE. **C.** Inmunohistoquímica con RBP4 capturada con un objetivo de 40x.



Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de expresión de ARNm para RBP4 en TAE fueron similares entre los pacientes CI y NCI ( $9,95\pm1,24$  u.a.;  $n=16$  frente a  $10,36\pm1,01$  u.a.;  $n=19$ ,  $p=0,283$ ). Los niveles de expresión de ARNm para el TAS tampoco mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CI y NCI ( $9,74\pm1,32$  u.a.;  $n=18$  frente a  $10,57\pm1,47$  u.a.;  $n=19$ ,  $p=0,084$ ).

Posteriormente, se ha investigado la expresión proteica de 23 pacientes mediante un análisis de western blot. Así, se ha encontrado un mayor contenido proteico



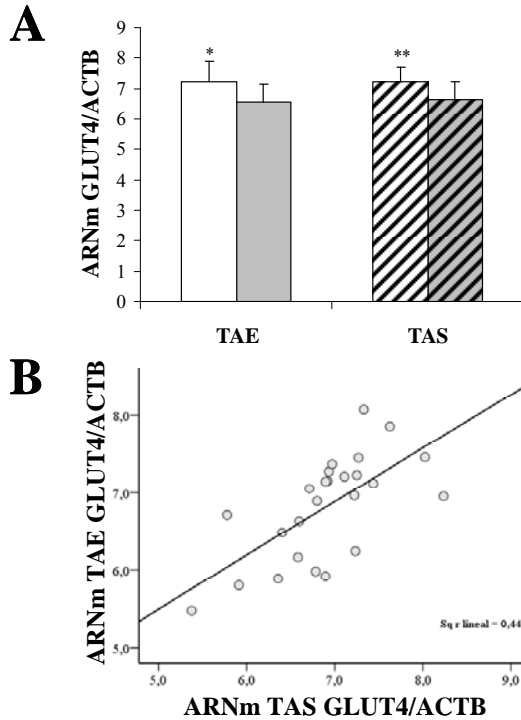
en el TAE de pacientes con CI frente a los NCI ( $0,63 \pm 0,27$  u.a.;  $n=10$  frente a  $0,41 \pm 0,16$  u.a.;  $n=13$ ,  $p=0,039$ ). Sin embargo, estas diferencias no han sido encontradas en las muestras de TAS ( $0,64 \pm 0,64$  u.a.;  $n=10$  frente a  $0,47 \pm 0,49$  u.a.;  $n=13$ ,  $p=0,499$ ), como se muestra en la Figura 20B.

Para determinar si RBP4 se expresaba en los adipocitos, se han realizado análisis de inmunohistoquímica. Como se esperaba, la expresión proteica de RBP4 en las muestras de tejido adiposo provenía principalmente de los adipocitos (Figura 20C).

Existe una relación entre RBP4 y el transportador de glucosa GLUT4, ya que la eliminación específica de este transportador en adipocitos de ratón provoca el aumento de la expresión de RBP4 en el tejido adiposo [Tamori, Sakaue, *et al.* 2006]. Así, se ha analizado la expresión de ARNm en el TAE y en el TAS de 28 pacientes. Los resultados obtenidos han mostrado que la expresión de GLUT4 disminuye en el TAE de pacientes con CI con respecto a los NCI ( $6,55 \pm 0,60$  u.a.;  $n=13$  frente a  $7,21 \pm 0,67$  u.a.;  $n=14$ ,  $p=0,012$ ).

Además, esta diferencia también ha sido detectada en el TAS ( $6,63 \pm 0,59$  u.a.;  $n=14$  frente a  $7,21 \pm 0,51$  u.a.;  $n=14$ ,  $p=0,009$ )

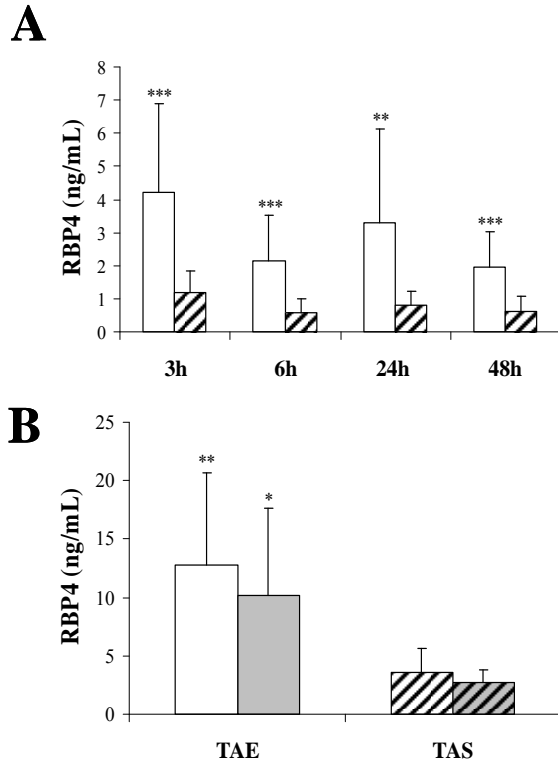
(Figura 21A). De esta manera, se ha podido observar una fuerte correlación positiva de la expresión de ARNm de GLUT4 entre ambos tejidos ( $r^2=0,44$ ;  $p<0,001$ ; Figura 21B).



**Figura 21. A.** Expresión de ARNm de GLUT4 en TAE y TAS de 28 pacientes sin/con CI (barras blancas/grises, respectivamente), representado como u.a. Los asteriscos indican la significatividad estadística entre NCI y CI;  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ . **B.** Correlación de la expresión de GLUT4 entre TAE y TAS.  $r^2=0,44$ .

**Diferencias en el patrón de secreción entre TAE y TAS**

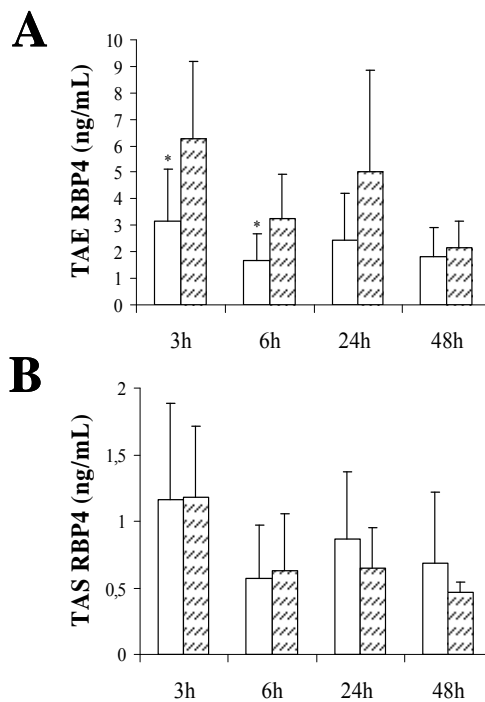
Se ha considerado la secreción de RBP4 por parte del TAE y del TAS de 18 pacientes. El perfil de secreción se ha estudiado a diferentes tiempos (3, 6, 24 y 48 horas de cultivo), para eliminar los posibles artefactos debidos a la contaminación por suero o por proteínas intracelulares.



**Figura 22.** Secreción de RBP4 al medio de cultivo por parte del TAE (lisas) y el TAS (rayadas). **A.** Secreción a distintos tiempos de cultivo. **B.** Secreción acumulada usando mezcla del medio a todos los tiempos y dividiendo a los pacientes en NCI (blancas) y CI (grises). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas entre TAE y TAS; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Los patrones de secreción a 3, 6, 24 y 48 horas tras el cultivo del tejido mostraron una mayor secreción de RBP4 del TAE que del TAS (Figura 22A). Así, los niveles de secreción del TAE fueron  $4,21 \pm 2,68 \text{ ng/mL}$ ,  $2,13 \pm 1,39 \text{ ng/mL}$ ,  $3,30 \pm 2,81 \text{ ng/mL}$  y  $1,93 \pm 1,09 \text{ ng/mL}$  a 3, 6, 24 y 48 horas respectivamente. Sin embargo, los niveles de secreción del TAS fueron  $1,17 \pm 0,65 \text{ ng/mL}$ ,  $0,59 \pm 0,41 \text{ ng/mL}$ ,  $0,79 \pm 0,45 \text{ ng/mL}$  y  $0,62 \pm 0,45 \text{ ng/mL}$  a 3, 6, 24 y 48 horas, respectivamente. Las diferencias estadísticas de la secreción de RBP4 entre TAE y TAS han sido muy significativas a todos los tiempos.

El análisis de la secreción acumulada a todos los tiempos de RBP4 en pacientes CI y NCI está representado en la Figura 22B. No se encontraron diferencias entre los dos grupos de pacientes con respecto a la secreción de RBP4 en el TAE ( $10,18 \pm 7,46 \text{ ng/mL}$  en CI y  $12,81 \pm 7,84 \text{ ng/mL}$  en NCI,  $p=0,491$ ) o en el TAS ( $2,70 \pm 1,05 \text{ ng/mL}$  en CI y  $3,59 \pm 2,00 \text{ ng/mL}$  en NCI,  $p=0,267$ ). Tras clasificar las muestras según la presencia/ausencia de diabetes, se ha observado que la secreción de RBP4 por parte del TAE fue mayor en estos pacientes que en aquellos sin diabetes a los tiempos de 3h ( $3,18 \pm 1,94 \text{ ng/mL}$  en no diabéticos frente a  $6,27 \pm 2,91 \text{ ng/mL}$  en diabéticos) y 6h ( $1,66 \pm 1,00 \text{ ng/mL}$  en no diabéticos frente a  $3,27 \pm 1,65 \text{ ng/mL}$  en diabéticos). Sin embargo, estas diferencias no fueron detectadas en el TAS (Figura 23).



**Figura 23.** Secreción de RBP4 al medio de cultivo (a distintos tiempos) por parte del TAE (A) y del TAS (B) de pacientes diabéticos (barras con líneas) y no diabéticos (barras lisas). \* $p<0.05$  muestra las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes.

### **Discusión del capítulo cinco**

En este capítulo, se ha descrito por primera vez que el TAE expresa y secreta RBP4. Los resultados obtenidos muestran que los pacientes con CI presentan un mayor contenido proteico de RBP4 en el TAE y una menor expresión de GLUT4 en el TAE y el TAS que los pacientes sin CI. Se ha estudiado la secreción de RBP4 en TAE y TAS, apreciando una mayor secreción de RBP4 en el TAE que en el TAS.

En los últimos años, los investigadores se han centrado en estudiar el TAE principalmente por su papel prometedor en la fisiopatología de la enfermedad coronaria. Sin embargo, no está claro si este tejido adiposo protege o daña a las arterias coronarias. Diferentes estudios han demostrado que el TAE produce adrenomedulina, una molécula vasodilatadora y anti-oxidativa [Silaghi, Achard, *et al.* 2007] y la proteína desacoplante-1 (UCP-1) que protege al miocardio frente a la hipotermia [Sacks, Fain, *et al.* 2009]. No obstante, otras moléculas producidas por el TAE como fosfolipasa A2 [Dutour, Achard, *et al.* 2010], citoquinas inflamatorias [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Eiras, Teixeira-Fernandez, *et al.* 2008] y adipoquinas como quemerina, visfatina, vaspina, adiponectina disminuida, leptina [Spioglou, C, *et al.* 2010] o resistina [Langheim, Dreas, *et al.* 2010] podrían incrementar el riesgo de CI.

Varios estudios han demostrado que RBP4 es expresado por el tejido adiposo, macrófagos e hígado [D'Onofrio, Colantuoni, *et al.* 1985, Yang, Graham, *et al.* 2005, Broch, Ramirez, *et al.* 2009]. Este trabajo no sólo demuestra que los adipocitos epicárdicos expresan RBP4 sino que además el TAE es capaz de secretar esta adipoquina.

RBP4 proporciona una conexión interesante entre obesidad, resistencia a insulina e inflamación, y están surgiendo evidencias de que también está íntimamente relacionada con el desarrollo de la CI. Recientemente, Bobbert y colaboradores han mostrado que los niveles de RBP4 se revelan como un predictor independiente para el grosor de la íntima-media de la carótida. Así, la saturación de RBP4 con retinol está implicada en la patogénesis de la aterosclerosis [Bobbert, Raila, *et al.* 2010]. De este modo, se ha estudiado el contenido de ARNm y proteína en pacientes con y sin CI y se ha demostrado que TAE y TAS presentan un comportamiento diferente con respecto a los niveles de proteína y la CI. La expresión proteica de RBP4 fue mayor en TAE de pacientes de género masculino con CI frente a pacientes sin CI. Esta diferencia no ha

sido encontrada en TAS, donde los niveles de RBP4 eran similares en los grupos CI y NCI.

Estudios previos han tratado de encontrar una relación entre RBP4, la resistencia a insulina y el metabolismo de la glucosa. Como consecuencia, se han encontrado niveles mayores de RBP4 en el suero de pacientes con resistencia a insulina y diabetes de tipo II [Graham y Kahn 2007]. Sin embargo, otros grupos han expuesto que la expresión de RBP4 en tejido adiposo presentaba una mayor relación con la inflamación que con la resistencia a insulina [Yao-Borengasser, Varma, *et al.* 2007].

GLUT4 es un transportador que media la captación de glucosa estimulada por insulina, tanto en el músculo como en el tejido adiposo. Su expresión está regulada a la baja en tejido adiposo en el marco de la obesidad o la diabetes de tipo II [Graham y Kahn 2007]. De acuerdo con estas observaciones, se ha descrito una relación inversa entre RBP4 y GLUT4 en ratones *Glu4<sup>-/-</sup>*-tejido adiposo, en los cuales el descenso en la expresión de GLUT4 en el tejido graso está acompañada por un incremento de la expresión de RBP4 derivada de este tejido [Yang, Graham, *et al.* 2005]. Desgraciadamente, la resistencia a insulina en los pacientes estudiados no ha sido calculada empleando el método HOMA, al no disponer de los datos correspondientes a los niveles de insulina en ayuno de cada paciente. Sin embargo, estudios previos han demostrado una buena asociación entre la expresión de ARNm de GLUT4 y las condiciones de resistencia a insulina en tejido adiposo [Tejero, Proffitt, *et al.* 2004, McLaughlin, Sherman, *et al.* 2007].

En el presente trabajo, se ha evaluado la expresión de ARNm de GLUT4 en TAE y TAS de pacientes CI y NCI, y los resultados mostraron que ambos tejidos expresan niveles menores en pacientes con CI que en pacientes NCI. Además, la expresión de ARNm de GLUT4 está correlacionada positivamente entre el TAE y el TAS. Estos resultados indican que la CI está asociada con niveles elevados de RBP4 y baja expresión de GLUT4 en TAE. Quizás, el TAE está proporcionando los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa o la producción de adipoquinas.

Los datos planteados en este capítulo sugieren que el comportamiento de TAE y TAS en pacientes con enfermedad cardiovascular es diferente con respecto a RBP4. De acuerdo con esto, nuestros resultados apoyan el hecho de que el TAE libera al medio de cultivo niveles de RBP4 mayores que el TAS en pacientes con enfermedad

cardiovascular, independientemente de la CI. Quizás, las diferencias entre los niveles de ARNm y proteína halladas podrían deberse a rutas postraduccionales. Se ha encontrado una correlación negativa entre los triglicéridos plasmáticos y los niveles de expresión de RBP4 en el TAE ( $r=-0,419$ ;  $p=0,017$ ;  $n=32$ ); Además, el grupo de pacientes con CI utilizados para el análisis de expresión génica, presentaban mayor concentración de triglicéridos en plasma. Esto podría explicar el hecho de que no se detectaran diferencias en el TAE entre CI y NCI a nivel de ARNm.

De nuevo, tras el análisis de secreción de RBP4 en pacientes con/sin diabetes, se ha observado que los niveles de RBP4 secretados eran mayores en los pacientes diabéticos a las 3 y 6 horas de cultivo. En el grupo de pacientes NCI para el estudio de la secreción, había cuatro pacientes con diabetes y sólo dos en el grupo CI. Esto podría explicar los mayores niveles de secreción de RBP4 en los pacientes NCI con respecto a los CI. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para clarificar las rutas de señalización que relacionan el metabolismo de la glucosa, la isquemia coronaria y RBP4, para entender su regulación. Parece que esta ruta tiene implicaciones clínicas potencialmente relevantes y podría servir para definir dianas terapéuticas.

En conclusión, los hallazgos descritos contribuyen a ampliar los estudios previos sobre el TAE, mostrando que produce y libera RBP4 de una manera distinta a como lo hace el TAS. Además, en pacientes con CI solamente se incrementa el RBP4 del TAE, mientras que la expresión de GLUT4 disminuye en ambos tejidos con la presencia de CI. Estos resultados muestran que los cambios de expresión proteica de RBP4 con respecto a la CI son más un efecto local del TAE que una consecuencia de la expresión de ARNm de GLUT4. Aún así, se requieren más análisis para dilucidar la regulación de RBP4 en el TAE porque podría ser usado como una nueva diana implicada en el desarrollo de la CI.

# CAPÍTULO SEIS

## DISCUSIÓN GENERAL





## CAPÍTULO SEIS: DISCUSIÓN GENERAL

### **Proteoma y secretoma**

Aunque otros autores han elaborado estudios proteómicos en tejido adiposo humano subcutáneo o visceral [Alvarez-Llamas, Szalowska, *et al.* 2007, Corton, Botella-Carretero, *et al.* 2008, Bouwman, Claessens, *et al.* 2009, Perez-Perez, Ortega-Delgado, *et al.* 2009], en esta tesis se han realizado, por primera vez en la literatura, comparaciones del proteoma y el secretoma entre el tejido adiposo epicárdico y el subcutáneo de pacientes sometidos a cirugía cardíaca.

La búsqueda de biomarcadores y moléculas que sirvan como dianas para la aplicación terapéutica de nuevos fármacos, en una enfermedad tal como la cardiopatía isquémica, posee una gran importancia en la actualidad. Esta relevancia se debe en gran medida a las dimensiones epidémicas de la patología en el mundo desarrollado. Esas dianas terapéuticas deben corresponder a moléculas implicadas en procesos clave de la enfermedad en sí o tener una influencia especial sobre los factores que la desencadenan.

Existen distintos abordajes para realizar esta tarea de exploración. La búsqueda tradicional de la base genética de las enfermedades, que continúa su arduo trabajo en la actualidad, utiliza como caballo de batalla la genómica. La gran ventaja que presenta esta aproximación reside en que las células presentan de manera natural una maquinaria que permite la generación de copias de cadenas nucleotídicas con una secuencia determinada. Junto con los avances tecnológicos, la aplicación de estos sistemas naturales ha desarrollado una serie de técnicas que permiten conocer cuánto se está transcribiendo un gen en un determinado momento de la vida del individuo o en presencia de un factor concreto.

Sin embargo, no siempre coinciden los datos referentes a niveles de expresión génica y los niveles de proteína (que son los efectores funcionales hasta lo que conocemos). La diferencia en estos dos tipos de niveles de expresión se deben a distintos tipos de regulación (ya sea por medio de proteínas o pequeñas moléculas de ARN) o a procesos de rápido deterioro y/o degradación de las proteínas [Boehm y Slack 2006, Edwards y Myers 2007, Mbonye y Song 2009]. De esta forma, durante o tras la transcripción se pueden producir una serie de acontecimientos que hacen que el contenido proteico varíe, como mecanismos de regulación de la traducción o modificaciones postraduccionales. Todas estas regulaciones o modificaciones que no se

producen a nivel de ADN o ARNm se escapan del alcance de las técnicas genómicas. Para solventar este escollo, ha surgido una nueva batería de herramientas que se podrían englobar bajo el término proteómica.

Las técnicas proteómicas más utilizadas tanto en la investigación biológica y médica como en diagnóstico clínico han sido aquellas que, usando otra vez lo disponible en la naturaleza, se fundamentaban en la utilización de anticuerpos específicos para la detección de las proteínas de interés. Así, el western blot, los inmunoensayos enzimáticos en placa (conocidos como ELISA o EIA), la citometría de flujo (FACS) y el análisis multiplex (arrays o basados en bolas recubiertas de anticuerpo) pueden ser aplicados para la medida de uno o varios analitos simultáneamente de manera sensible, específica, reproducible y con amplio rango dinámico para la cuantificación de proteína. Concretamente, los ensayos multiplex son capaces de medir en la actualidad hasta cientos de analitos a la vez, ahorrando muestra, costes y tiempo, aunque en la mayoría de los casos requieren una laboriosa optimización. La principal limitación de las técnicas basadas en anticuerpos reside en el hecho de que las proteínas a estudiar se deben elegir previamente, con lo que se debe conocer qué es lo que se quiere analizar.

En las últimas décadas la electroforesis bi-dimensional se ha presentado con fuerza en el estudio proteómico por su capacidad para distinguir una gran variedad de modificaciones proteicas [O'Farrell 1975]. Esta técnica tiene la ventaja de que es capaz de identificar variaciones en el punto isoelectrico o en el tamaño de las proteínas, bien por cambios aminoacídicos que comporten una diferencia en la carga neta de la proteína como debido a modificaciones por adición de grupos radicales (fosforilaciones, glicaciones, etc.). Estas variaciones se visualizan en el gel como cambios en la movilidad electroforética. Sin embargo, su incorporación en el campo del diagnóstico se dificulta porque consume mucho tiempo y recursos.

Aún así, la electroforesis bi-dimensional proporciona datos que no se conseguían con las técnicas proteómicas clásicas, ya que permite tener una visión global de todas las proteínas contenidas en un tipo celular o tejido. Pero a diferencia de las técnicas basadas en anticuerpo, se necesita identificar las proteínas mediante técnicas acopladas como la espectrometría de masas. Por otra parte, tanto la electroforesis bi-dimensional acoplada a espectrometría de masas como las técnicas basadas en anticuerpo presentan como principal limitación el hecho de que están sujetos bien a la

identificación y aparición previa en las bases de datos de referencia o bien la disponibilidad del anticuerpo (ya que muchas veces no está comercializado), respectivamente, de las proteínas de interés.

La localización del tejido adiposo epicárdico y sus características anatómicas, le proporcionan gran interés como candidato a desempeñar un papel importante en el desarrollo de coronariopatías, aunque estudios en pacientes con lipodistrofia congénita general muestran que su presencia no es imprescindible para el desarrollo de la aterosclerosis [Sacks y Fain 2007, Gomes, Pardini, *et al.* 2009].

El interés de nuestro grupo de investigación se centró en conocer las diferencias proteicas entre dos muestras de un mismo paciente y tejido (ya que *a priori* todo es tejido adiposo), que presentaban como única característica definitoria su procedencia anatómica (grasa epicárdica o subcutánea). Para cumplir este objetivo, la electroforesis bi-dimensional suponía un buen abordaje. Así, se ha realizado esta aproximación experimental con 11 pacientes sometidos a cirugía cardíaca para obtener un total de 22 muestras. De estos pacientes un 18,2% eran diabéticos, un 72,7% hiperlipidémicos y un 81,8% hipertensos. También se han incluido hombres y mujeres (6 y 5, respectivamente) para intentar evitar posibles diferencias debidas al sexo. La mayoría de los estudios proteómicos realizados hasta la fecha han sido realizados con menor número de muestras (de manera general cuatro pares de muestras es lo comúnmente aceptado). Sin embargo, el hecho de no tener la posibilidad de obtener fácilmente pacientes con las mismas características clínicas exactas ha hecho que se aumentase de manera razonable esta población de partida.

No obstante, la curiosidad por encontrar diferencias entre estas muestras no se ha quedado sólo en el contenido proteico, sino también en su capacidad secretora. La liberación de proteínas desde el tejido adiposo epicárdico directamente sobre las arterias coronarias podría desencadenar una acción protectora o deletérea de este tejido, sobre todo en un contexto de cardiopatía isquémica. De este modo, se ha utilizado una aproximación proteómica para el estudio del denominado secretoma. La secretómica, o estudio del secretoma, constituye así un paso más en el estudio proteómico que permite indagar a cerca de las interacciones entre tejidos, pero no está exenta de problemas.

En el caso de los estudios de secretoma de células existe un inconveniente en cuanto a que la supervivencia de la mayoría de ellas en cultivo depende de la presencia de suero en el medio de cultivo. Esto dificulta el posterior análisis proteómico, sobre

todo de proteínas poco secretadas, ya que se verían enmascaradas por las proteínas del suero. Así, las células son generalmente cultivadas en medio sin suero durante un intervalo de tiempo determinado, que precisa de una optimización. Este concepto es de gran importancia ya que existe la posibilidad de que las células en cultivo sufran rotura, liberando proteínas citoplasmáticas al medio de cultivo que interferirán en el análisis [Skalnikova, Motlik, *et al.* 2011].

También es importante el lavado de las células o los tejidos durante el tiempo de cultivo con medio sin suero para evitar las proteínas plasmáticas, pero requiere de largos períodos de tiempo para que sea totalmente eficaz. Alvarez-Llamas y colaboradores, en su estudio sobre el secretoma de tejido adiposo visceral presentaban su optimización de los tiempos de lavado. Así, los mejores resultados los obtenían tras 5 pasos de lavados (1h-toda la noche-8h-4h-4h) previos a la adición del medio de condicionamiento [Alvarez-Llamas, Szalowska, *et al.* 2007]. Aún así, tras la realización de este protocolo, no todas las proteínas que encuentran en el medio de cultivo son secretadas por el tejido adiposo, ya que observan contaminación con proteínas séricas y citoplásmicas. Un protocolo interesante para solventar el inconveniente de la contaminación por células sanguíneas es el realizado por Bouwman y colaboradores, mediante el cual realizan tres geles; uno para el tejido adiposo subcutáneo, otro para los adipocitos aislados de una biopsia de ese tejido y un tercer gel para proteína de células sanguíneas aisladas. De esta manera, las diferencias encontradas entre los dos grupos de muestras de tejido eran cotejadas con sus correspondientes geles de adipocitos y células sanguíneas para determinar cuales eran debidas a la fracción adipocitaria [Bouwman, Claessens, *et al.* 2009]. Sin embargo, las diferencias presentes en proteínas comunes a las células sanguíneas y los adipocitos eran descartadas.

Otro problema reside en que, dependiendo del tiempo y tampón de lavado utilizados, podrían aparecer diferencias en cuanto al secretoma [Dowell, Johnson, *et al.* 2009], siendo importante comprobar la viabilidad celular al final del proceso en caso de tener cultivos celulares. En el presente estudio, no se ha comprobado dicha viabilidad del tejido tras las 48 horas de cultivo, pero se puede asumir que su integridad es suficiente, puesto que existen estudios sobre tejido adiposo en condiciones similares que utilizan tiempos de cultivo incluso superiores a cuatro días [Alvarez-Llamas, Szalowska, *et al.* 2007].

Por otra parte, un paso clave en estudios de secretoma de células aisladas es el de la obtención de una población celular homogénea, además de intentar minimizar al máximo el daño por estrés que se le produce a las células cuando se disgrega el tejido. En los estudios sobre medio de cultivo de explantes se asume una población celular heterogénea y el estrés celular debido a la extracción corporal no es comparable al de la disgregación tisular. Por esta razón, en el desarrollo de esta tesis se ha optado por la utilización de explantes en vez de separar los distintos tipos celulares del tejido adiposo, aunque la posterior interpretación de los datos debe de llevarse a cabo con cautela, porque el tipo celular predominante no tiene por que ser el que más contribuye a una cantidad de proteína determinada. Para evitar este escollo, se han realizado experimentos de inmunohistoquímica para algunas proteínas, con el objetivo de comprobar la presencia de la proteína de interés en los adipocitos de la muestra utilizada.

Otro punto importante reside en que la mayoría de las proteínas secretadas se producen en pequeñas cantidades, siendo necesario un paso de concentración previo al análisis y dependiendo del método de concentración que se utilice (precipitación, ultracentrifugación, cromatografía en columna) se puede tener una mayor o menor pérdida en proteínas como algunos autores han demostrado previamente [Canals, Colome, *et al.* 2006, Dowell, Johnson, *et al.* 2009]. En este trabajo se ha realizado una concentración de los secretomas con columnas de exclusión por tamaño que permite la retención inespecífica de las proteínas en el propio medio de cultivo.

Una vez obtenidos los datos de los estudios proteómicos (salvo en el caso de los basados en anticuerpo), es necesario realizar una cuidadosa interpretación de los resultados. En algunos casos, es recomendable la utilización de técnicas adicionales para la verificación de dichos resultados. La necesidad de la verificación en los estudios de secreción se debe a que, aunque se parta de una buena optimización, no se puede descartar contaminación debida a proteínas presentes en el medio de cultivo o intracelulares como se ha comentado anteriormente. La presencia de ese tipo de proteínas se puede intentar determinar mediante herramientas bioinformáticas o tratamientos diferenciales como por ejemplo brefeldina A (que bloquea la ruta convencional de secreción) o el KCN (que provoca la rotura inespecífica de las células).

Los protocolos de marcaje de aminoácidos también son una herramienta utilizada para intentar reconocer proteínas de nueva síntesis en los secretomas y así, el

protocolo CILAIR (comparación de tasas de incorporación de aminoácidos marcados con isótopo) ha sido utilizado por varios autores con distintas variantes. Roelofsen y colaboradores han utilizado CILAIR para su estudio de secreción por parte del tejido adiposo omental [Roelofsen, Dijkstra, *et al.* 2009] mientras que Hocking y colaboradores han usado cromatografía de afinidad con lectinas seguido de CILAIR para comparar secretomas de tejido adiposo visceral y subcutáneo [Hocking, Wu, *et al.* 2010]. En ambos estudios tienen una alta identificación de proteínas implicadas en matriz extracelular, SPARC (proteína que une calcio y colágeno), receptores de membrana, etc., indicando que no se consigue aislar del todo al sistema biológico para identificar adipoquinas en el medio de cultivo [Roelofsen, Dijkstra, *et al.* 2009, Hocking, Wu, *et al.* 2010].

Tampoco se pueden descartar mecanismos de secreción no convencional, que son procesos de excreción al medio extracelular de moléculas evitando la ruta tradicional dependiente del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi [Nickel y Seedorf 2008, Prudovsky, Tarantini, *et al.* 2008]. Las posibles explicaciones para la existencia de este mecanismo de secreción alternativo pueden ser dos: a) moléculas que no pueden ser secretadas por la vía convencional, como es el caso de las lectinas que se agregarían provocando un deterioro de su transporte; b) proteínas que pueden ser secretadas por la vía convencional pero que cuando lo hacen, como es el caso del factor crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), por alguna razón, sufren modificaciones postraduccionales típicas de la ruta convencional y se vuelven afuncionales [Nickel 2010].

Las principales rutas de secreción no convencional conocidas hasta la fecha son cuatro [Prudovsky, Tarantini, *et al.* 2008]: 1) formación de vesículas o yemas en la superficie de la membrana plasmática que posteriormente se separan y se rompen en el medio extracelular; 2) la ruta endolisosomal, donde se traslocan las proteínas del citosol a los endolisosomas que se fusionan con la membrana; 3) traslocación a través de la membrana plasmática, que es la vía utilizada por la IL-1 $\alpha$  o el FGF; y 4) secreción mediada por exosomas cuyos constituyentes típicos incluyen moléculas expresadas ubicuamente, como enzimas metabólicos intracelulares ( $\alpha$ -enolasa), proteínas del citoesqueleto (actina y moesina) y proteínas de choque térmico [Thery, Boussac, *et al.* 2001, van Niel, Raposo, *et al.* 2001, Pisitkun, Shen, *et al.* 2004].

Como ya se ha comentado anteriormente, la aproximación utilizada para la realización de esta tesis se ha basado en la utilización de electroforesis bi-dimensional seguida de la identificación por espectrometría de masas de las manchas que presentaban diferencias entre tejidos o grupos. Asimismo, se ha realizado la identificación de las bandas obtenidas tras electroforesis mono-dimensional de los medios de cultivo de explantes. Para poder realizar los análisis y las posteriores identificaciones, es necesario detectar y cortar las manchas/bandas, respectivamente. En este trabajo dicha visualización se ha llevado a cabo mediante una tinción con azul brillante de Coomassie, una de las tinciones de proteínas más utilizadas para geles de poli-acrilamida [Neuhoff, Arold, *et al.* 1988]. Esta elección se ha basado en observaciones realizadas en la literatura con anterioridad.

De este modo, distintos grupos han realizado diferentes comparaciones entre las distintas tinciones comercializadas, con el objetivo de determinar cuál era la mejor para su utilización en proteómica. Los métodos de tinción fluorescente tienen un rango dinámico mayor que la tinción con azul de Coomassie permitiendo detectar manchas proteicas que contengan menor cantidad de proteína. Sin embargo, cuando se estudian proteínas muy abundantes se debe modificar el tiempo de exposición o la apertura del sistema de captación para evitar una saturación de la señal fluorescente. De este modo, la detección de las manchas menos abundantes se ve comprometida [Smejkal, Robinson, *et al.* 2004]. Sin normalización, la tinción con azul de Coomassie presenta valores de “volumen medio de mancha” comparables a los de las tinciones fluorescentes con cantidades totales bajas de proteína cargada en el gel. Además, por lo comentado anteriormente, estos valores incluso son mejores cuando la cantidad total de proteína es superior a 100µg.

Un aumento de la sensibilidad de la tinción de Coomassie se puede conseguir digitalizando los geles con fluorescencia en el infrarrojo cercano [Luo, Wehr, *et al.* 2006], en cuyo caso el azul de Coomassie es comparable a la tinción con Sypro Ruby, pero presenta el inconveniente de que se requiere equipamiento especializado [Harris, Churchward, *et al.* 2007]. La tinción de plata sería más sensible que Sypro Ruby o azul de Coomassie, pero también presenta complicaciones tales como la mezcla de manchas cercanas, tinción negativa por sobre-exposición [Rabilloud 1990] y además es más susceptible a la variabilidad entre geles [Quadroni y James 1999].

Recientemente, Yang y colaboradores han desarrollado un método combinado entre Sypro Ruby y azul brillante de Coomassie coloidal según la cual determinaban que este nuevo método de tinción salvaba por una parte el inconveniente de la invisibilidad a simple vista de la fluorescencia y por otra la baja sensibilidad de la tinción con azul de Coomassie. Sin embargo, aunque comparan la tinción combinada contra la tinción con Sypro Ruby en cuanto a la recuperación de péptidos, observando identificaciones similares, no muestran la comparación de estas tinciones frente a la tinción de azul de Coomassie [Yang, Wang, *et al.* 2011]. Cabe tener en cuenta que la compatibilidad de las distintas tinciones con la espectrometría de masas, necesaria para la identificación de proteínas, es un punto de gran importancia. Así, Sypro Ruby presenta menor compatibilidad que el azul de Coomassie con este tipo de identificación, ya que se reduce la recuperación de péptidos que contienen cisteína y en menor grado los que contienen triptófano [Berggren, Chernokalskaya, *et al.* 2000, Ball y Karuso 2007]. Además, comparando con Sypro Ruby, tanto la intensidad de señal como el ratio entre señal y ruido de fondo obtenidos en la huella peptídica son mejores en muestras teñidas con Coomassie [Lanne y Panfilov 2005].

Para realizar una validación de los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante las técnicas de electroforesis mono-/bi-dimensional visualizadas con azul de Coomassie, una vez identificadas por espectrometría de masas, se han usado técnicas proteómicas basadas en anticuerpo y genómicas. Por una parte, las técnicas genómicas nos dan una idea de la respuesta que se está produciendo por parte del tejido adiposo y además nos permite eludir la posible contaminación en la muestra de eritrocitos, puesto que su contenido de ARNm es limitado [Kabanova, Kleinbongard, *et al.* 2009]. Por otra parte, las técnicas proteómicas nos aportan gran información sobre el contenido celular en proteína, de las posibles regulaciones que se puedan estar llevando a cabo, así como la posibilidad de poder inferir qué modificaciones postraduccionales están sufriendo las proteínas de interés de este estudio.

Los resultados obtenidos confirmaron la hipótesis de partida, ya que presentan diferentes niveles proteicos entre los tejidos adiposos epicárdico y subcutáneo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca y la presencia de la cardiopatía isquémica modifica estos niveles proteicos. Para la realización de los experimentos se han utilizado muestras de un total de 105 pacientes de los cuales aproximadamente el 63%



fueron hombres y el 51% estaban afectados por cardiopatía isquémica. En el Anexo 2 se puede encontrar una tabla resumen de las características clínicas de los pacientes.

Previamente, diversos estudios encontraron diferencias entre TAE y otros tejidos adiposos a nivel de ARNm en modelos animales y humanos [Company, Booth, *et al.* 2010, Fain, Sacks, *et al.* 2010]. En estos estudios de expresión génica no tienen en cuenta la posible regulación peri-/postraduccional, y pese a que proporcionan mucha información sobre el comportamiento del tejido adiposo epicárdico no son suficientes para su total comprensión. Dada la ausencia de estudios proteómicos comparativos entre tejido adiposo epicárdico y subcutáneo, nuestro grupo de investigación se ha planteado los objetivos del trabajo que ha dado lugar a la presente tesis.

El estudio en humanos que, hasta el momento, más se parece a la aproximación llevada a cabo por nuestro grupo de investigación es el llevado a cabo por Pérez-Pérez y colaboradores. En él, tras la comparación de tejido adiposo omental y subcutáneo mediante DIGE, hallaron diferencias en proteínas relacionadas con metabolismo, síntesis y plegado de proteínas, transporte lipídico, respuesta a estrés e inflamación [Perez-Perez, Ortega-Delgado, *et al.* 2009]. Algunas de estas proteínas, como el caso de GSTP1, coinciden con el presente estudio y otras están relacionadas en cuanto a función, por ejemplo PDIA1, implicada en el correcto plegamiento de proteínas.

Mediante los estudios proteómicos de exploración realizados en el desarrollo de este trabajo ha sido posible encontrar una batería de proteínas que presentan diferentes patrones de manchas o bandas entre TAE y TAS.

En el estudio proteómico mostrado en el capítulo tres se ha manifestado que existe una diferencia no sólo en la cantidad de proteína total, sino también a nivel de modificaciones postraduccionales. La acción de muchos enzimas se encuentra íntimamente relacionada bien con la activación mediante procesos de modificación postraduccional (de los cuales los más frecuentes son las fosforilaciones) o bien simplemente con un incremento de la cantidad de enzima que eleva la capacidad de un sistema para transformar un determinado sustrato. Los patrones de manchas de catalasa y GSTP1 son similares entre los dos tejidos, variando la cantidad de proteína. Al mismo tiempo, se ha demostrado mediante inmunoprecipitación que la aparición de más de una mancha para cada proteína estudiada se debe, al menos en parte, a la presencia de fosforilaciones.

En cuanto a la secreción observada, se ha puesto de manifiesto en el capítulo cuatro que existen diferencias entre el tejido adiposo epicárdico y el subcutáneo. La primera observación es que, en términos de proteína total, el tejido adiposo epicárdico secreta mayor cantidad de proteína al medio de cultivo que el tejido adiposo subcutáneo. Estudios previos habían demostrado que adiponectina, expresada y secretada principalmente por adipocitos, presentaba niveles de expresión génica mayores en la grasa epicárdica [Iglesias, Eiras, *et al.* 2006]. Así, cabría esperar que se pudiesen detectar cambios en cuanto a la secreción de esta proteína al medio de cultivo, pero en el presente estudio no se ha identificado adiponectina en el secretoma, lo cual podría ser debido a la coincidencia de más proteínas en la misma banda. Sin embargo, sí se ha observado una mayor secreción de APOA1, GSTP1 y RBP4 (esta última en el capítulo cinco) en tejido adiposo epicárdico que en tejido adiposo subcutáneo.

A continuación se detallan algunas características de cada una de las proteínas estudiadas más en profundidad y su relevancia, para posteriormente discutir las posibles inter-relaciones en cuanto a su actividad en diversos contextos.

**Catalasa** es un enzima de localización peroxisomal. Está formado por un homotetrámero cuyas subunidades tienen un peso aproximado de 60kDa, contienen un grupo hemo en el sitio activo, el cual está localizado internamente y presenta un acceso estrecho, lo que explicaría su capacidad para utilizar solamente sustratos de pequeño tamaño [Kirkman y Gaetani 2007]. Utiliza como sustrato peróxido de hidrógeno rompiendo dos moléculas de éste para formar una molécula de oxígeno y dos de agua. La mayor fuente de peróxido de hidrógeno en la célula es la mitocondria y debido a su localización no está claro cómo catalasa puede reducir los efectos de este radical, por lo cual se han dado varias posibilidades para explicar este hecho: a) que existan bajos niveles de catalasa dentro de la mitocondria [Radi, Turrens, *et al.* 1991], aunque no se ha encontrado ninguna señal en la secuencia de catalasa ni observaciones que apoyen esta hipótesis; b) que el  $H_2O_2$  difunda libremente, aunque esta explicación se topa con la baja difusión del  $H_2O_2$  frente a la distancia que separa estos orgánulos [Forkink, Smeitink, *et al.* 2010]. Sin embargo, catalasa y catalasa conjugada con polietilenglicol (PEG) previenen la inhibición de la fosforilación, mediada por insulina, de AKT (serina-treonina quinasa) que se produce cuando aumenta el estrés oxidativo en adipocitos 3T3-L1. Así, en dos modelos de ratón obeso (*ob/ob* e inducido por dieta rica en ácidos grasos), la resistencia a insulina mejora en cuanto a tolerancia a glucosa,

sensibilidad a insulina y glucosa plasmática tras la ingesta de PEG-catalasa [Ikemura, Nishikawa, *et al.* 2010]. Aún así, la controversia sobre su papel específico en el balance red-ox celular se debe a que mientras que en eucariotas inferiores se ha visto que la inactivación de la catalasa peroxisomal acorta la vida [Petriv y Rachubinski 2004], en ratones *knock out* para la catalasa se observa un desarrollo normal y son individuos aparentemente sanos, incluso fértiles, hasta el año de vida [Ho, Xiong, *et al.* 2004]. No obstante, la sobre-expresión de catalasa mitocondrial provoca un aumento de aproximadamente un 20% en el tiempo de vida de estos animales, con un retraso asociado del desarrollo de enfermedades propias de la edad como las cataratas o patologías cardíacas [Schriner, Linford, *et al.* 2005].

**PDIA1** (proteína disulfuro isomerasa) se localiza principalmente en el retículo endoplásmico, pertenece a la familia de proteínas disulfuro isomerasa y tiene un peso de ~55kDa. Es una proteína multifuncional que juega importantes papeles en la modificación co-/postraducciona de proteínas y plegamiento proteico, aliviando el estrés del retículo endoplásmico [Appenzeller-Herzog y Ellgaard 2008]. Una activación de la ruta de respuesta a proteínas mal plegadas puede causar una acumulación de ROS intracelular provocando toxicidad [Malhotra y Kaufman 2007]. Específicamente PDIA1 contiene dos dominios tiorredoxina y está implicada en la formación, rotura y reordenamiento de puentes disulfuro funcionando como chaperona que inhibe la agregación de proteínas mal plegadas cuando se encuentra a altas concentraciones [Wang, Fast, *et al.* 1997]. En la superficie celular parece que actúa como una reductasa que rompe puentes disulfuro de proteínas unidas a la célula [Kroning, Kahne, *et al.* 1994, Noiva 1999]. Además puede formar parte de otros enzimas, así PDI es la subunidad beta del homotetrámero de la prolil-4-hidroxilasa (P4HB), enzima implicado en la biosíntesis de colágeno [Pihlajaniemi, Helaakoski, *et al.* 1987]. También forma un heterodímero con una proteína de ~97kDa, llamada proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTTP o MTP), a la que se le atribuye una actividad de transferencia lipídica y es esencial para el ensamblaje y la secreción de APOB [Wang, Fast, *et al.* 1997].

El enzima **PGAM1** (fosfoglicerato mutasa 1) es una proteína intracelular ampliamente distribuida y un peso molecular de ~29kDa. Se presenta en forma de homodímero en la mayoría de los tejidos excepto el muscular, donde puede aparecer formando heterodímeros con la isoforma PGAM2 (predominante en este tejido). Está

implicado en la ruta glicolítica catalizando la reacción reversible entre (2↔3)-fosfoglicerato [Zhang, Yu, *et al.* 2001]. Un incremento en la glicolisis ha sido asociado con protección frente a estrés oxidativo [Kondoh, Lleonart, *et al.* 2007] y los niveles de PGAM1 se incrementan en fibroblastos incubados bajo condiciones de hipoxia [Takahashi, Takahashi, *et al.* 1998].

**GSTP1** (glutación S-transferasa P) es una proteína presente en el citosol, núcleo y mitocondrias de todos los organismos aerobios, de ~23kDa. La familia de las glutación S-transferasas intervienen en un amplio rango de procesos de detoxificación y su papel en el metabolismo de xenobióticos, a los que le transfieren glutación [Sheehan, Meade, *et al.* 2001], pero también confiere protección frente a estrés oxidativo [Goto, Kawakatsu, *et al.* 2009]. Se ha observado que mutaciones en el gen que codifica para GSTP1, dando lugar a las variantes Ile105Val y Val105Val, constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de *diabetes mellitus* de tipo II, patología que contribuye a la enfermedad cardiovascular [Ramprasath, Senthil Murugan, *et al.* 2011].

**CLIC1** (Canal intracelular de cloro tipo 1), también denominada NCC27, existe como proteína integral de membrana o como proteína soluble en el citoplasma. Tiene un peso molecular de ~27kDa, funciona como canal de iones cloruro y realiza las funciones biológicas de regular el volumen celular y la acidez de orgánulos intracelulares. Es una proteína de la familia CLIC, que está compuesta por siete miembros (CLIC 1-5, p64 y *parchorin*). Esta familia se define por un segmento C-terminal de 240 aminoácidos que presenta una homología estructural baja (18% de cobertura de secuencia según el BLAST) con glutación S-transferasa omega-1 [Dulhunty, Gage, *et al.* 2001]. En la enfermedad de Alzheimer CLIC1 induce la generación de ROS tras su traslocación a la membrana de las células de la microglía dando lugar a una conductancia de aniones. Esta conductancia, en respuesta a la modulación red-ox de ROS derivadas de NADPH oxidasa, proporciona un mecanismo que reaviva y sostiene la generación de ROS por parte de NADPH oxidasa [Chang, Wu, *et al.* 2009]. En distintos tipos de cáncer se ha encontrado aumentada la expresión de CLIC1 y por ello se postula que pueda estar ejerciendo una acción similar a la citada anteriormente, contribuyendo a la generación constitutiva de ROS que se produce en la progresión de la enfermedad [Chang, Wu, *et al.* 2009]. Por ello se ha considerado un candidato a estudio para determinar su validez potencial como marcador en cáncer.

**APOA1** (apolipoproteína A1) es una proteína de ~28kDa y el constituyente proteico principal de las lipoproteínas de alta densidad. Se sintetiza principalmente en el intestino delgado y el hígado [Elshourbagy, Boguski, *et al.* 1985, Zannis, Cole, *et al.* 1985], siendo el primero de ellos el principal contribuyente de las concentraciones plasmáticas [Wu y Windmueller 1979]. Su secreción puede estar afectada por la presencia de ácidos grasos insaturados, como se ha comprobado en células epiteliales del intestino de cerdo [Wang, Berschneider, *et al.* 1997], o por ácidos grasos oxidados, como se ha demostrado en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2 [Rong, Ramachandran, *et al.* 2002]. De manera general, sus niveles están positivamente correlacionados con el colesterol HDL y negativamente con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Los efectos cardioprotectores del HDL han sido atribuidos a la capacidad que tiene APOA1 para iniciar la salida de colesterol y su transporte desde los tejidos periféricos para su posterior eliminación en el hígado, en lo que se denomina ruta inversa de transporte de colesterol [Singh, Shishehbor, *et al.* 2007]. Estudios en modelos animales comprobaron que los ratones transgénicos que sobre-expresan APOA1 humana desarrollan menos lesiones ateroscleróticas tempranas, estría grasa, pese a ser alimentados con dietas aterogénicas [Rubin, Krauss, *et al.* 1991]. Además, en otro modelo de ratón deficiente en APOE se ha demostrado que la sobre-expresión génica de APOA1 suprime la aterosclerosis de manera marcada [Plump, Scott, *et al.* 1994]. Otros efectos protectores de APOA1 consisten en su capacidad para aumentar la fibrinólisis [Saku, Ahmad, *et al.* 1985], inhibir la agregación plaquetaria [Yui, Aoyama, *et al.* 1988], prevenir la oxidación del LDL [Parthasarathy, Barnett, *et al.* 1990] y eliminar peróxidos lipídicos o lípidos oxidados de partículas de LDL ligeramente modificadas [Navab, Hama, *et al.* 2000a, Navab, Hama, *et al.* 2000b].

**FABP4** es una proteína intracelular de ~14kDa que pertenece a la familia de proteínas de unión a ácidos grasos. Esta familia comprende a una serie de proteínas de bajo peso molecular (14-15kDa) que se unen con una afinidad alta a ligandos hidrofóbicos como eicosanoides y ácidos grasos de cadena larga in-/saturados [Coe y Bernlohr 1998, Hertz et al. 2000]. Se ha encontrado expresión de FABP4 en adipocitos y macrófagos donde se encuentra principalmente regulado por insulina, ácidos grasos y agonistas de PPAR $\gamma$  [Coe y Bernlohr 1998]. Pese a que FABP4 se usa como un marcador de diferenciación en adipocitos, el modelo de ratón *knockout* para esta proteína muestra un fenotipo normal desarrollando incluso adipocitos maduros

[Hotamisligil, Johnson, *et al.* 1996]. La explicación de este hecho se debe a que en este ratón modificado existe una sobre-expresión de FABP5 que parece compensar la carencia de la otra isoforma.

**RBP4** (proteína de unión al retinol tipo 4) es una adipoquina de ~21kDa, con aspecto globular y compacto que se une de manera específica al retinol. Es la responsable de su transporte por la sangre [Quadro, Blaner, *et al.* 1999] y puede ser filtrada libremente a través de la membrana glomerular. RBP4 se encuentra unido habitualmente a tetrámeros (~56kDa) de transtirretina (transportador de hormona tiroidea) de ~14kDa, formando complejos 1:1 suficientemente grandes para evitar la filtración glomerular [Mody, Graham, *et al.* 2008]. En un principio se había observado que era secretada por el hígado, pero recientemente, también se ha visto que pueden realizar esta secreción tanto macrófagos [Broch, Ramirez, *et al.* 2009] como adipocitos [Yang, Graham, *et al.* 2005, Janke, Engeli, *et al.* 2006]. Los niveles circulantes de RBP4 y su expresión en tejido adiposo están aumentados en varios modelos de obesidad y resistencia a insulina de ratón, siendo probable que RBP4 constituya el nexo de unión entre estas dos patologías [Yang, Graham, *et al.* 2005, Graham, Yang, *et al.* 2006]. La expresión de RBP4 se ha encontrado inversamente relacionada con la de GLUT4 en ratones [Yang, Graham, *et al.* 2005] y cuando es liberada por adipocitos es capaz de atenuar la fosforilación de IRS-1 inducida por insulina de manera autocrina o paracrina en adipocitos primarios humanos [Ost, Danielsson, *et al.* 2007].

#### **Anatomía y fisiología del tejido adiposo epicárdico**

La obesidad lleva a un aumento del tejido adiposo. Sin embargo, no sólo es importante la acumulación excesiva de tejido sino también su distribución. De este modo, el tejido adiposo epicárdico, que es el objeto de análisis de esta tesis, podría jugar un papel importante en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

La obesidad (en general) está relacionada con cambios estructurales y funcionales del corazón, aunque su papel directo en el desarrollo de la enfermedad todavía no está esclarecido. Entre estos cambios se encuentran la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la dilatación de la aurícula izquierda y el deterioro subclínico de las funciones sistólica y diastólica [Abel, Litwin, *et al.* 2008]. El seguimiento a 30 días de los pacientes de la cohorte de Framingham, mostró una disminución de la fracción de

eyección del ventrículo izquierdo y un mayor riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular a medida que aumentaba el IMC [Kenchiah, Evans, *et al.* 2002].

Hoy en día, mediante el uso de técnicas de imagen como la ecocardiografía, la tomografía computarizada o la resonancia magnética, se puede discernir entre el tejido adiposo y el miocardio subyacente, cosa que era bastante difícil en los estudios de autopsia [Reiner, Mazzoleni, *et al.* 1955]. Con la ayuda de estas técnicas se ha podido determinar que el tejido adiposo epicárdico aumenta en obesidad [Sons y Hoffmann 1986, Iacobellis, Ribaudo, *et al.* 2004], presentando asociaciones con la cantidad de tejido adiposo visceral y con la severidad de la hipertrofia del ventrículo izquierdo [Iacobellis, Assael, *et al.* 2003, Iacobellis, Ribaudo, *et al.* 2004].

Por otra parte, se ha postulado que se produce un incremento en la masa cardíaca como resultado del incremento de tejido adiposo epicárdico e infiltración de grasa en el miocardio [Abel, Litwin, *et al.* 2008]. Otros autores informaron acerca de la penetración de tejido adiposo epicárdico en la pared del ventrículo derecho reemplazando el miocardio existente [Sons y Hoffmann 1986] aunque posteriormente se ha observado que la presencia de tejido en esta región es muy común [Tansey, Aly, *et al.* 2005, Tandri, Castillo, *et al.* 2006, Kim, Choe, *et al.* 2007]. Además, en pacientes obesos se ha advertido una mayor captación y utilización de ácidos grasos así como una mayor acumulación de triglicéridos por parte del miocardio [Peterson, Herrero, *et al.* 2004, Iacobellis y Leonetti 2005].

El tamaño de los adipocitos epicárdicos se correlaciona con la adiposidad, casi llegando a doblar su tamaño de área en personas con obesidad mórbida [Sons y Hoffmann 1986, Rabkin 2007] aunque esta correlación no parece cumplirse de manera lineal [Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2010]. De manera similar, la cantidad de tejido adiposo epicárdico aumenta con la edad pero esta relación no se mantiene en individuos mayores de 40 años [Rabkin 2007], lo cual induce a pensar que el propio tamaño de los adipocitos puede estar afectado por otros mecanismos.

Durante la diferenciación de los adipocitos, se produce un cambio de morfología que los lleva de una apariencia fibroblástica a esférica que no es debida solamente a la acumulación de lípidos [Kuri-Harcuch, Wise, *et al.* 1978, Spiegelman y Green 1981, Gregoire, Smas, *et al.* 1998]. Estos cambios morfológicos se ven acompañados de cambios a nivel molecular que implican la regulación en la expresión de determinados genes implicados en la organización citoesquelética, el reordenamiento

de la matriz extracelular y el metabolismo. Además, los adipocitos maduros también secretan al medio extracelular moléculas como adiponectina [Hu, Liang, *et al.* 1996].

Otra de las proteínas que aumenta su expresión génica es FABP4, siendo considerada como un marcador de la etapa terminal de diferenciación para adipocitos [Gregoire, Smas, *et al.* 1998, Poulain-Godefroy y Froguel 2007]. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación determinaron que el tejido adiposo epicárdico presenta adipocitos de tamaño inferior [Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2010] y niveles de adiponectina más bajos que el tejido adiposo subcutáneo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca [Iglesias, Eiras, *et al.* 2006]. En el presente trabajo se ha determinado que también los niveles de expresión de ARNm para FABP4 son inferiores, lo cual parece apuntar a un menor estadio de diferenciación del tejido adiposo epicárdico frente al subcutáneo.

Otros grupos de investigación aportan datos para sostener esta teoría. Por una parte, estudios de tejido y de cultivo primario de adipocitos humanos han demostrado que existe diferencia en tamaño y acumulación de grasa dependiendo de la procedencia del tejido. Los adipocitos procedentes del tejido adiposo epicárdico son más pequeños que los subcutáneos o viscerales [Chatterjee, Stoll, *et al.* 2009]. También se había observado que el tejido adiposo subcutáneo expresaba más adiponectina y FABP4 que el tejido adiposo visceral o epicárdico [Baker, Silva, *et al.* 2006, van Beek, Bakker, *et al.* 2007, Chatterjee, Stoll, *et al.* 2009, Fain, Sacks, *et al.* 2010], mientras que no parece haber diferencias según la procedencia del tejido adiposo subcutáneo [Kremen, Dolinkova, *et al.* 2006, Fain, Sacks, *et al.* 2010].

Si el tamaño y la expresión de FABP4 se pueden considerar buenos marcadores de la diferenciación adipocitaria, el tejido adiposo epicárdico estaría en un estadio más temprano de diferenciación que el tejido adiposo subcutáneo. Al encontrarse menos atrofiado podría liberar mayor cantidad de factores al medio de cultivo. En este sentido, otros autores han demostrado que los adipocitos perivasculares humanos exhiben un estado de diferenciación adipocitaria reducido y un nivel mayor de expresión y secreción de citoquinas inflamatorias comparado con adipocitos de otras localizaciones regionales [Chatterjee, Stoll, *et al.* 2009]. Esto está de acuerdo con las observaciones realizadas en el capítulo cuatro en el que se ha mostrado que el tejido adiposo epicárdico es más activo que el subcutáneo en cuanto al total de proteína secretada.



La unión de FABP4 a ácidos grasos provoca la traslocación al núcleo de este complejo, donde activa a PPAR $\gamma$  [Damcott, Moffett, *et al.* 2004] que es uno de los principales factores de transcripción implicados en la diferenciación de adipocitos [Gregoire, Smas, *et al.* 1998]. Los factores de transcripción PPARs funcionan como heterodímeros con el receptor de ácido retinoico que une directamente secuencias de repetición en el promotor de sus genes diana [Spiegelman, Puigserver, *et al.* 2000]. En el capítulo cinco se ha comentado que el tejido adiposo epicárdico presenta una mayor secreción de RBP4 al medio de cultivo pero, al igual que las observaciones de Fain y colaboradores, sin cambiar la expresión génica [Fain, Sacks, *et al.* 2010]. Esta molécula es el principal transportador de retinol en sangre y se ha visto que el tejido adiposo visceral es la principal fuente de RBP4 [Kloting, Graham, *et al.* 2007]. El hecho de que se libere en mayor medida de manera local en el epicardio parece indicar que esta molécula o sus ligandos podrían estar ejerciendo una función autocrina, paracrina o endocrina sobre tejido adiposo, coronarias o cardiomiocitos.

Una vez que se ha desencadenado el proceso de diferenciación PPAR $\gamma$  mantiene a los adipocitos en la etapa de diferenciación terminal [Vazquez-Vela, Torres, *et al.* 2008]. PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción que regula multitud de genes importantes para el adipocito. Entre estos genes se encuentran adiponectina y catalasa [Tsuchida, Yamauchi, *et al.* 2005, Okuno, Matsuda, *et al.* 2008]. Parece plausible sugerir que a menor cantidad de FABP4 en tejido adiposo epicárdico, menor activación de PPAR $\gamma$ ; lo que conllevaría una posible regulación a la baja de la expresión de catalasa y adiponectina, dos hechos que han sido observados bien durante la realización del presente estudio o bien previamente por nuestro grupo de investigación [Iglesias, Eiras, *et al.* 2006].

Como ya se ha comentado anteriormente, el tejido adiposo en general, y el epicárdico en particular, funcionan como almacén de energía en forma de ácidos grasos por lo que su papel en el metabolismo de glúcidos y lípidos es muy relevante. El principal regulador de la actividad metabólica del tejido adiposo es la insulina y la consecuencia metabólica de un inadecuado funcionamiento de ésta en el adipocito, lo que se conoce como resistencia a insulina, depende del estado de alimentación del individuo.

Para disminuir la resistencia a insulina existe un mecanismo que consiste en el reclutamiento de nuevos adipocitos debido a que aumenta la capacidad de almacenar

lípidos. Además, la acción de PPAR $\gamma$  incrementando la expresión de GLUT4 y adiponectina, contribuye también a un menor riesgo de desarrollar resistencia a insulina [Lee, Olson, *et al.* 2003, Vazquez-Vela, Torres, *et al.* 2008]. La expresión génica de GLUT4 ha sido relacionada con su actividad en varios trabajos [Garvey, Maianu, *et al.* 1991, Tejero, Proffitt, *et al.* 2004, McLaughlin, Sherman, *et al.* 2007], aunque la funcionalidad de este receptor depende también de su redistribución desde los compartimentos intracelulares a la membrana plasmática [Leney y Tavaré 2009]. Desgraciadamente, la dificultad técnica que supone observar la traslocación de GLUT4 a la membrana de los adipocitos de las biopsias utilizadas para el estudio ha propiciado que no se comprobase esta traslocación.

No se han encontrado diferencias en cuanto a la expresión génica de GLUT4 en el total de la población estudiada, pero sin embargo sí que se han encontrado diferencias en otras proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa. Así, PGAM1, molécula implicada en la regulación del flujo glicolítico, presenta cambios a nivel de patrón de manchas como se ha observado en el capítulo tres, lo que parece indicar que la actividad de esta proteína podría estar incrementada aumentando la utilización de glucosa, puesto que esta proteína presenta varios lugares de fosforilación que están implicados en su regulación [Vander Heiden, Locasale, *et al.* 2010].

Una liberación localizada de ácidos grasos por parte del tejido adiposo epicárdico expondría al corazón y a las coronarias a una concentración excesiva de lípidos y sus metabolitos, como por ejemplo el DAG, que provocarían un deterioro de la ruta de transducción de señales de insulina desencadenando resistencia a esta señal [Savage, Petersen, *et al.* 2007, Chen y Hess 2008]. En trabajos con ratones se ha observado que el KO para FABP4 tiene disminuida la lipólisis [Coe, Simpson, *et al.* 1999] y no desarrollan resistencia a insulina inducida por dieta [Hotamisligil, Johnson, *et al.* 1996]. En cuanto a FABP4, no hay diferencias de expresión entre las distintas localizaciones de tejido adiposo en individuos delgados pero sí que las hay en obesos, donde es más alta en tejido adiposo subcutáneo que en el omental [Fisher, Eriksson, *et al.* 2001]. Las observaciones del presente trabajo muestran que el tejido adiposo epicárdico presenta niveles de expresión génica menores de FABP4 que el subcutáneo, sin embargo, no hay diferencias en cuanto a la cantidad de proteína.

Tanto la expresión en tejido adiposo como la concentración en plasma de RBP4, otra proteína implicada en el transporte de moléculas hidrofóbicas, se han visto

incrementadas en diversos modelos de ratón que desarrollan resistencia a insulina [Yang, Graham, *et al.* 2005, Fernandez-Real, Moreno, *et al.* 2008]. El tejido adiposo epicárdico muestra niveles y el tratamiento con agonistas de PPAR mejora la sensibilidad a insulina reduciendo los niveles de RBP4 [Wu, Wei, *et al.* 2009].

La ruta peroxisomal de la oxidación de ácidos grasos presenta a la catalasa como un componente integral. En pacientes húngaros, su deficiencia se relaciona con alta frecuencia de diabetes [Goth y Eaton 2000]. Por otro lado el tratamiento con catalasa o sustancias miméticas produce una mejora en la resistencia a insulina en modelos de ratón inducidos por dieta [Ikemura, Nishikawa, *et al.* 2010] o por urea, en los que se ha visto un aumento de resistina y RBP4 [D'Apolito, Du, *et al.* 2010]. El hecho de que catalasa se encuentre disminuida en el tejido adiposo epicárdico parece indicar que la actividad peroxisomal, para la utilización de ácidos grasos en esta localización, es menor y que podría estar jugando un papel en el proceso de resistencia a insulina.

Tras la activación de PPARs por ácidos grasos o fármacos que afectan el metabolismo lipídico se produce un control de la expresión de genes implicados en el metabolismo intra-/extracelular de lípidos, siendo más notables sus efectos sobre la beta oxidación peroxisomal. Esta activación media parcialmente un efecto inductor sobre los niveles de colesterol HDL, regulando la transcripción hepática de sus principales componentes APOA1 y APOA2 [Schoonjans, Staels, *et al.* 1996]. Además, las concentraciones plasmáticas de HDL, aunque no directamente las de APOA1, han sido relacionadas con resistencia a insulina [Couillard, Lamarche, *et al.* 1996]. Tomando todos los datos en conjunto podría ser que un incremento del tejido adiposo epicárdico supusiera un mecanismo contribuyente al desarrollo de resistencia a insulina.

### **Estrés oxidativo**

La mayoría de los factores de riesgo asociados a la cardiopatía isquémica (*e.g.* tabaquismo, dieta, diabetes y obesidad), contribuyen a la progresión de la enfermedad por medio de mecanismos de estrés oxidativo, caracterizados por un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno [Fearon y Faux 2009]. Así, la diabetes se ha relacionado con la aterosclerosis vía estrés oxidativo [Hink, Li, *et al.* 2001], mientras la hipercolesterolemia inducida por la dieta y por el LDL oxidado provocan

disfunciones en el endotelio o los macrófagos por medio de daño en el ADN o estrés oxidativo [Martinet, Knaapen, *et al.* 2001, Ceaser, Ramachandran, *et al.* 2003].

En estudios a gran escala, basados en la comunidad de pacientes de Framingham, se ha demostrado que un exceso de estrés oxidativo sistémico está asociado con obesidad [Keaney, Larson, *et al.* 2003]. Por otra parte, la obesidad está considerada como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado debido a que los niveles circulantes de varias citoquinas pro-inflamatorias están incrementados en individuos obesos [Trayhurn 2007]. Esta inflamación sistémica no sólo se debe al aumento de tejido adiposo, sino que también contribuyen a ella otros órganos donde cabe destacar al hígado [Berg y Scherer 2005]. De este modo se establece una fuerte relación entre tejido adiposo, inflamación y estrés oxidativo.

La hipertrofia excesiva de los adipocitos produce cambios a nivel de la producción de adipoquinas y comienzan a mostrar estados de hipoxia, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico [Yu y Ginsberg 2005]. En individuos obesos los adipocitos rodeados por macrófagos muestran defectos a nivel estructural que afectan a la membrana plasmática y al retículo endoplásmico, pudiendo provocarles la muerte por una vía distinta de apoptosis o necrosis [Ramalho y Guimaraes 2008]. El reclutamiento de este tipo celular se realiza de forma activa, mediante la producción de moléculas como MCP-1, al menos en pacientes obesos [Weisberg, McCann, *et al.* 2003].

Las citoquinas inflamatorias no sólo están producidas por las células inmunes sino que también se ha visto que son secretadas por los adipocitos de modo que contribuyen al desarrollo de la resistencia a insulina. Un ejemplo de mecanismo que relaciona a las citoquinas inflamatorias con la resistencia a insulina lo proporcionan IL-6 y TNF $\alpha$ . El aumento de IL-6 contribuye a la inflamación sistémica de grado bajo [Greenberg, Nordan, *et al.* 1992, Mohamed-Ali, Goodrick, *et al.* 1997, Kern, Ranganathan, *et al.* 2001] y TNF $\alpha$  es capaz de inhibir la señalización a través del receptor de insulina [Hotamisligil, Budavari, *et al.* 1994] e incrementar la lipólisis provocando la liberación de ácidos grasos [Green, Dobias, *et al.* 1994, Boden 1997, Yu y Ginsberg 2005]. Esta liberación ha sido considerada como un estímulo inflamatorio provocando la activación de las rutas de NF $\kappa$ B y PPAR $\gamma$ , que inducen la fosforilación de IRS-1 [Gao, Zhang, *et al.* 2004, Shi, Kokoeva, *et al.* 2006]. La activación de estas rutas probablemente también sea la encargada de modular la reducción de la adipogénesis y la lipólisis [Ruan, Hachohen, *et al.* 2002, Yu y Ginsberg 2005]. La menor

producción de proteínas consideradas anti-inflamatorias, como adiponectina, también contribuyen a la patogénesis de la resistencia a insulina [Berg y Scherer 2005, Maeda, Cao, *et al.* 2005].

Existen diferencias entre los distintos compartimentos de tejido adiposo en cuanto a la producción de mediadores inflamatorios. Así, se ha visto una mayor expresión o secreción de este tipo de adipocinas en los tejidos adiposos omental [Fried, Bunkin, *et al.* 1998] y epicárdico [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003], cuando se los compara con el subcutáneo. El incremento de los productos avanzados de oxidación de proteínas inhibe la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1, que además adquieren un fenotipo inflamatorio. También se ha demostrado que en ancianos y pacientes con síndrome metabólico existe un deterioro en la diferenciación de los pre-adipocitos lo cual está considerado un mecanismo subyacente de la enfermedad cardiovascular [Zhou, Peng, *et al.* 2010].

Algunos estímulos inflamatorios (como TNF $\alpha$  y LPS) pueden favorecer la secreción de proteínas por la vía no convencional [Prudovsky, Tarantini, *et al.* 2008]. Esto podría explicar la observación (en el capítulo cuatro) de GSTP1 en el medio de cultivo de explantes, algo que se describió anteriormente en queratinocitos, modelo celular usado en secreción porque presenta una tasa baja de lisis celular en cultivo [Keller, Ruegg, *et al.* 2008].

El tejido adiposo se ha considerado como poco vascularizado, pudiendo considerarse un tejido próximo a la hipoxia [Wood, de Heredia, *et al.* 2009]. La respuesta a bajas concentraciones de oxígeno se lleva a cabo mediante factores de transcripción específicos, de los cuales la subunidad 1 $\alpha$  del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) es considerada como un sensor de O<sub>2</sub> molecular [Semenza 1998]. La regulación de este factor se realiza mediante su degradación casi inmediata, pero bajo condiciones de hipoxia los enzimas con dominio prolil-hidrolasa (encargados de esta degradación) se encuentran inactivados y HIF-1 $\alpha$  está estabilizado pudiendo ejercer su función [Wood, de Heredia, *et al.* 2009]. Como se ha mencionado anteriormente, PDI forma parte de la proteína P4H, una prolil-hidrolasa que se ha visto relacionada con hipoxia en la regulación de la síntesis de colágeno tipo II en condrocitos [Grimmer, Balbus, *et al.* 2006]. La subunidad HIF-1 $\alpha$  se ha encontrado disminuida en el tejido adiposo epicárdico con respecto al tejido adiposo omental [Fain, Sacks, *et al.* 2010]. En el capítulo tres se ha observado una mayor expresión de PDIA1 en este tejido, lo que

podría estar explicado por una diferente vascularización entre los tejidos adiposos. De este modo podría considerarse al tejido adiposo epicárdico como más vascularizado que el subcutáneo al igual que ocurría con el visceral [Villaret, Galitzky, *et al.* 2010]. En el capítulo cuatro se ha observado una mayor secreción total del tejido adiposo epicárdico comparado con el tejido adiposo subcutáneo, que podría indicar una mayor necesidad de vascularización en esta localización. Curiosamente, al observar el aspecto macroscópico de ambas grasas cuando llegan al laboratorio, el tejido adiposo subcutáneo presenta una mayor cantidad de sangre que el tejido adiposo epicárdico en la inmensa mayoría de los casos.

Datos recientes en la literatura han informado que los adipocitos generan especies reactivas del oxígeno [Furukawa, Fujita, *et al.* 2004]. Los niveles de estrés oxidativo en tejido adiposo son mayores en ratones obesos y diabéticos debido a un aumento en las NADPH oxidasas y un descenso en los enzimas anti-oxidantes, provocando una expresión desregulada de MCP-1 y adiponectina [Furukawa, Fujita, *et al.* 2004]. Así, en tejido adiposo de ratones obesos se ha observado un aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno junto con una disminución de los niveles de catalasa [Furukawa, Fujita, *et al.* 2004, Okuno, Matsuda, *et al.* 2008]. El peróxido de hidrógeno desencadena, al igual que otras especies reactivas del oxígeno, la producción de moléculas inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-8 [DeForge, Preston, *et al.* 1993] y moléculas de adhesión a neutrófilos [Lo, Janakidevi, *et al.* 1993]. Por otro lado, cuando se realiza un tratamiento anti-oxidante sobre adipocitos en cultivo se atenúa la expresión de genes inflamatorios como TNF $\alpha$  y MCP-1, lo cual sugiere que el estrés oxidativo en los adipocitos es una de las causas de los cambios que en él se producen a nivel de inflamación [Sakurai, Nishioka, *et al.* 2008]. El ejercicio físico también disminuye los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y provoca un descenso de la peroxidación lipídica en tejido adiposo visceral, pero no del subcutáneo [Sakurai, Izawa, *et al.* 2009].

Los datos bibliográficos apuntan a que el tejido adiposo epicárdico se comporta de manera distinta en términos de inflamación y estrés oxidativo. En el presente estudio se ha demostrado que el tejido adiposo epicárdico presenta niveles de estrés oxidativo mayores que el tejido adiposo subcutáneo en muestras de pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Así, en el capítulo tres se relata como mediante la técnica de electroforesis bi-dimensional se observan modificaciones postraduccionales de enzimas anti-oxidantes (GSTP1, PDIA1 y PGAM1) y una menor expresión de catalasa en grasa epicárdica con

respecto a grasa subcutánea, sugiriendo una posible relación entre estos enzimas y el estrés oxidativo. Los cambios en los niveles de expresión o los distintos patrones de modificaciones postraduccionales, unidos a los datos del posterior ensayo de reducción de NBT, han confirmado la sospecha inicial de que el estrés oxidativo era mayor en el tejido adiposo epicárdico. Además, gracias a la separación enzimática de los distintos tipos celulares se ha puesto de manifiesto que la diferencia en cuanto a la producción de radicales libres procedía de la fracción adipocitaria.

### **Cardiopatía isquémica**

La cardiopatía isquémica es una patología que implica el desarrollo de un proceso de hipoxia que podría desencadenar a su vez mecanismos de inflamación, resistencia a insulina y estrés oxidativo. Este proceso de hipoxia podría estar afectando también a estructuras distintas del corazón, como el tejido adiposo, que está en íntimo contacto con las arterias coronarias y el miocardio. Se ha observado que la infiltración de macrófagos es más alta en tejido adiposo epicárdico de pacientes con cardiopatía isquémica que en no isquémicos, expresada como aumento de ARNm de CD68, un marcador de este tipo celular [Zhou, Wei, *et al.* 2011]. En pacientes con cardiopatía isquémica, los niveles de expresión de proteínas pro-inflamatorias están elevados, mientras que adiponectina está disminuida en tejido adiposo epicárdico o adipocitos perivasculares comparado con subcutáneo [Mazurek, Zhang, *et al.* 2003, Iglesias, Eiras, *et al.* 2006, Eiras, Teijeira-Fernandez, *et al.* 2008]. Asimismo, muestran una diferenciación reducida, con niveles bajos de expresión de ARNm de PPAR $\gamma$  y FABP4 [Chatterjee, Stoll, *et al.* 2009]; molécula, ésta última, de la cual también se observan en el presente estudio niveles de expresión menores en tejido adiposo epicárdico.

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en el desarrollo de la aterosclerosis en general y de la cardiopatía isquémica en particular. Existen datos previos que indican que en el tejido adiposo perivascular aumenta la disfunción endotelial vía estrés oxidativo dependiente de NADPH oxidasa [Ketonen, Shi, *et al.* 2010]. También el peróxido de hidrógeno desencadena la producción de VCAM-1 en la pared vascular [Lo, Janakidevi, *et al.* 1993] provocando la unión de monocitos y linfocitos T, los cuales se encuentran tanto en los ateromas experimentales como en los ateromas humanos tempranos. Como se ha visto previamente, la menor expresión de catalasa y la mayor generación de radicales libres (medidas en el ensayo NBT) podría

estar ayudando a la generación de más estrés oxidativo y contribuir al desarrollo de la cardiopatía isquémica.

En análisis *post mortem* de muestras humanas, se observó que PDI estaba sobre-expresado en el miocardio de la región peri-infarto con respecto al miocardio alejado de la lesión [Severino, Campioni, *et al.* 2007]. La sobre-expresión de esta proteína en modelos animales de ratón, provoca una reducción del tamaño del infarto y una reducción significativa de la apoptosis en la región peri-infarto [Severino, Campioni, *et al.* 2007]. Por otra parte, la inhibición de PDI en el endotelio lleva a un incremento de la apoptosis, una disminución en la migración y adhesión celulares, así como la formación tubular. Esto indica que PDI puede jugar un papel integral en la apoptosis y la angiogénesis, contribuyendo a la creación de nuevas arteriolas coronarias para proteger al corazón frente a la isquemia miocárdica [Tian, Zhou, *et al.* 2009]. PDI se utiliza como marcador de activación de la ruta de degradación de proteínas mal plegadas y en un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa MCP-1 específicamente en el corazón, presenta niveles de expresión elevados. Este aumento del estrés del retículo endoplásmico está relacionado con la aparición de la cardiopatía isquémica [Azfer, Niu, *et al.* 2006].

La hipoxia que se podría producir en el transcurso de la enfermedad podría también desencadenar un aumento del flujo glicolítico reflejado como un aumento de PGAM1, al igual que ocurre en fibroblastos [Takahashi, Takahashi, *et al.* 1998]. Sin embargo, nuestros resultados han demostrado una menor expresión de GLUT4 en tejido adiposo (epicárdico y subcutáneo) de pacientes con cardiopatía isquémica, indicando que el tejido adiposo cambia su comportamiento en condiciones de isquemia.

Diversos estudios han mostrado que la ausencia de FABP4 protege frente la aterosclerosis en modelos de ratón [Makowski, Boord, *et al.* 2001, Boord, Maeda, *et al.* 2002, Boord, Maeda, *et al.* 2004] y el tratamiento oral en este modelo animal con un inhibidor de FABP4 resulta un agente efectivo contra la aterosclerosis severa [Furuhashi, Tuncman, *et al.* 2007]. Observaciones previas muestran que los niveles de esta proteína en sangre suelen estar aumentados en pacientes con cardiopatía isquémica frente a controles y que estos valores se incrementan a la vez que aumenta el número de vasos afectados [Rhee, Lee, *et al.* 2009, Jin, Peng, *et al.* 2010]. Los datos aquí presentados muestran una disminución de los niveles de expresión pero no de secreción de FABP4 en pacientes con cardiopatía isquémica frente a pacientes con valvulopatía.

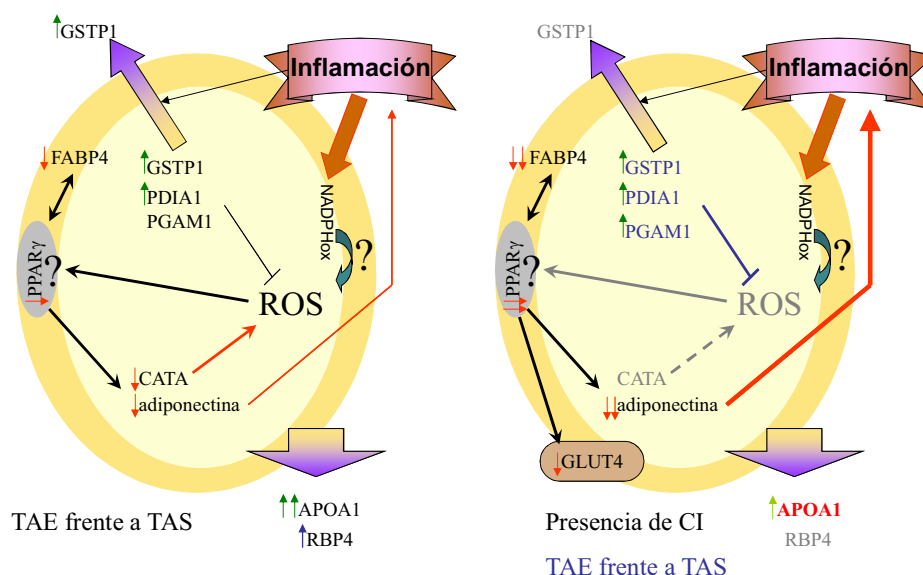


Esto parece indicar que el tejido adiposo epicárdico no es el responsable de la diferencia sérica. Aún así, podría reflejar un cambio en el metabolismo lipídico del tejido adiposo epicárdico durante el transcurso de la cardiopatía isquémica. Los ácidos grasos son el combustible preferente de los cardiomiocitos adultos, pero esto cambia en condiciones de isquemia [Lopaschuk, Ussher, *et al.* 2010]. De este modo, el tejido adiposo epicárdico podría estar modificando su comportamiento para adecuarse a la menor demanda de ácidos grasos del corazón isquémico.

Al igual que FABP4, RBP4 podría estar implicado en el desarrollo de la cardiopatía isquémica ya que pertenece también a la familia de las lipocalinas, que ha sido relacionada recientemente con enfermedad cardiovascular por medio de otro de sus miembros, la lipocalina 2 [Choi, Lee, *et al.* 2008]. En este trabajo se ha visto que los niveles de expresión proteica de RBP4 en grasa epicárdica eran menores en pacientes no isquémicos, sin estar acompañados de una diferencia de expresión génica. En cuanto a la secreción, pese a no alcanzar valores estadísticamente significativos, los niveles extracelulares tendían a ser contrarios a los intracelulares, sugiriendo que la diferencia en cuanto a la expresión proteica podía deberse en parte a la secreción diferencial. Bobbert y colaboradores habían mostrado que RBP4 estaba relacionado con la patogénesis de la aterosclerosis [Bobbert, Raila, *et al.* 2010] y las concentraciones plasmáticas de este transportador están relacionados con el síndrome metabólico [Lin, Lai, *et al.* 2009]. Uno de los marcadores más fiables para detectar estrés oxidativo es la oxidación del ADN, que junto con la oxidación de lípidos se sabe que son dos mecanismos responsables del desarrollo de aterosclerosis y cáncer [Park, Kyoung Park, *et al.* 2009]. De hecho, se ha encontrado que el daño en el ADN provocados por radicales libres se encuentra elevado en pacientes con CI [Botto, Masetti, *et al.* 2002, Demirbag, Yilmaz, *et al.* 2005a, Demirbag, Yilmaz, *et al.* 2005b, Mutlu-Turkoglu, Akalin, *et al.* 2005]. Además, la susceptibilidad del ADN a la oxidación medido en leucocitos, está correlacionado negativamente con la cantidad de carotenos en sangre [Park, Kyoung Park, *et al.* 2009]. Los carotenos son los precursores de retinol y además funcionan como moléculas anti-oxidantes, lo cual proporciona un nexo de unión con la proteína RBP4.

En relación con el transporte lipídico también se encuentra APOA1, principal componente del HDL. Se han descrito varias hipótesis para intentar explicar el papel protector de HDL frente a la aterosclerosis [Santos-Gallego, Ibanez, *et al.* 2008]. Por

una parte, HDL provoca una inhibición de la oxidación de LDL y además provoca un flujo de colesterol hacia el exterior de las células espumosas. También tiene efectos sobre la expresión de moléculas de adhesión a nivel de la pared vascular. APOA1 ejerce un papel sobre la liberación del colesterol de los adipocitos sin aumentar su expresión y esto provoca un aumento en el transporte reverso de colesterol [Bencharif, Hoareau, *et al.* 2010]. Además, los niveles de HDL junto con los de LDL son utilizados de rutina para la predicción del riesgo cardiovascular según el perfil lipídico del paciente. Así, los pacientes con cardiopatía isquémica presentan niveles de colesterol HDL y de APOA1 inferiores a los pacientes sin coronariopatía [Gordon, Castelli, *et al.* 1977, Jacobs, Mebane, *et al.* 1990]. Los principales productores corporales de APOA1 son el intestino y el hígado; sin embargo, se han encontrado evidencias en este trabajo de que el tejido adiposo expresa y secreta al exterior esta proteína. Los datos obtenidos sobre la secreción de APOA1 del TAE son especialmente importantes debido a que se han encontrado diferencias significativas que muestran que su liberación es mayor en el grupo de pacientes NCI que en el de CI. Todo parece indicar que una pérdida en la secreción de APOA1 por parte del tejido adiposo epicárdico, conllevaría a nivel local a una mayor probabilidad de desarrollar aterosclerosis en las arterias coronarias y así desencadenar los procesos de cardiopatía isquémica.



**Figura 24.** Posibles relaciones en TAE de pacientes sometidos a cirugía cardíaca. **A.** El TAE está considerado un tejido con perfil inflamatorio. Esta inflamación podría estar modulando la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), posiblemente debido a un aumento de las NADPH oxidasas. Esta producción de ROS estaría contrarrestada por el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes en el TAE, como GSTP1 y PDIA1. La expresión de FABP4 está mediada por el factor de transcripción PPAR $\gamma$ , que a su vez regula la expresión de CATA y adiponectina. FABP4 también es capaz de regular a PPAR $\gamma$  y es posible que exista una modulación por parte de las ROS de este u otros factores de transcripción. De este modo, la menor presencia de FABP4 provocaría una menor activación de PPAR $\gamma$ , llevando a una menor expresión de CATA y adiponectina que contribuirían al aumento de las ROS e inflamación, respectivamente. Además, se conoce que la inflamación es capaz de aumentar la secreción por la vía no convencional de GSTP1. Por otro lado, el TAE secreta niveles mayores de RBP4 y APOA1 que el TAS. **B.** En pacientes con cardiopatía isquémica (CI) se acentúa la diferencia en cuanto a la expresión de enzimas antioxidantes con relación al TAS. Sin embargo, no existen diferencias en cuanto a la expresión de CATA (y en el presente trabajo no se ha determinado si los pacientes con CI presentan niveles de ROS mayores que pacientes sin CI). Lo que sí se ha observado es una menor expresión del receptor de glucosa GLUT4. Curiosamente, esta expresión también está influida por PPAR $\gamma$ . Asimismo, se aprecia una menor cantidad de FABP4, que podría determinar una menor activación de PPAR $\gamma$ , contribuyendo a disminuir GLUT4, pero también provocando la disminución de adiponectina y consecuentemente aumentando la inflamación (datos que corresponden con la bibliografía en relación a la cardiopatía isquémica). Un dato muy significativo de este trabajo reside en la menor secreción de APOA1 por parte del TAE en pacientes con CI. Este hecho podría estar contribuyendo al desarrollo de la enfermedad coronaria por el importante papel que juega APOA1 en la aterosclerosis.

### **Limitaciones del estudio**

La mayor limitación de esta tesis reside en el propio objeto de estudio, es decir, el tejido adiposo epicárdico. Concretamente, en la cantidad de grasa epicárdica que llega al laboratorio, que es demasiado escasa para poder realizar todos los distintos análisis (2DE, explantos, western blot, expresión génica, etc.) con un mismo paciente.

La comparación de los tejidos estudiados aquí entre pacientes con enfermedad cardiovascular e individuos sanos sería muy interesante. Sin embargo, por motivos éticos, no se puede tener acceso a muestras de tejido adiposo epicárdico de individuos sanos que se sometan a un proceso de esternotomía, ya que estos individuos sanos deberían ajustarse lo máximo posible a las características clínicas de los pacientes con enfermedad cardiovascular.

Debido a la presencia de la enfermedad cardiovascular en el momento de recogida de las muestras, no se puede identificar si las observaciones realizadas son causa o consecuencia del desorden cardíaco. También existe la posibilidad de que algún factor de confusión altere los resultados del presente estudio, dado que la inclusión de los pacientes en el estudio ha sido de manera consecutiva. Pero el hecho de incorporar todos los pacientes posibles al análisis sin selección previa, otorga una idea más precisa de lo que ocurre en la población real en el contexto preciso de pacientes que se someten a cirugía cardíaca.

Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado una serie de estudios exploratorios para la búsqueda de diferencias entre tejido adiposo de distintas localizaciones. Por ello, no se conocían *a priori* qué proteínas iban a presentar diferencias entre los tejidos o las patologías. De esta manera serán necesarios estudios mecanísticos enfocados sobre las proteínas encontradas con el objetivo de describir su contribución a la fisiología del tejido adiposo epicárdico y a la enfermedad coronaria.

**Resumen final**

Durante la realización de esta tesis se ha podido demostrar, por primera vez en la literatura, que el tejido adiposo epicárdico presenta mayor estrés oxidativo que el tejido adiposo subcutáneo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. La expresión de enzimas anti-oxidantes que presentan diferencias en cuanto a su cantidad o a modificaciones postraduccionales (CATA, GSTP1, PDIA1 y PGAM1) sugiere una posible relación de ellos con el mayor estrés oxidativo encontrado en este tejido. Gracias a la separación de los componentes celulares del tejido adiposo, se ha podido evidenciar que los cambios en la producción de radicales libres entre los dos tejidos provienen de la fracción adipocitaria.

Las diferencias entre estos dos tejidos no se limitaban sólo a esta observación, sino que también se han encontrado cambios a nivel de la secreción. Así, el tejido adiposo epicárdico es más activo, en términos de secreción proteica, que el tejido adiposo subcutáneo. En este aspecto, el tejido adiposo epicárdico secreta al medio de cultivo mayor cantidad de moléculas de transporte lipídico (APOA1 y RBP4) y anti-oxidantes (GSTP1) con respecto al tejido adiposo subcutáneo.

En el contexto de la cardiopatía isquémica, se ha observado que los pacientes con esta patología tienen aumentadas las diferencias de expresión de los enzimas anti-oxidantes GSTP1, PDIA1 y PGAM1 entre los dos tejidos. Además, también presentan diferencias a nivel de expresión en el tejido adiposo epicárdico de FABP4 y RBP4, sugiriendo modificaciones en el transporte lipídico. Sin embargo, el dato más relevante en este contexto se refleja en la menor secreción de APOA1 por parte del tejido adiposo epicárdico en pacientes con cardiopatía isquémica frente a pacientes sin coronariopatía, dada la importancia de esta molécula como predictor del riesgo cardiovascular.

Los cambios observados en el tejido adiposo epicárdico, con respecto al subcutáneo, y su proximidad a las arterias coronarias y al miocardio subyacente sugieren que este tejido pueda estar jugando un papel en la aparición o la progresión de la cardiopatía isquémica.



# CAPÍTULO SEETE

## CONCLUSIONES





## CAPÍTULO SIETE: CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de la presente tesis se redactan a continuación.

En cuanto a las diferencias entre el tejido adiposo epicárdico y el tejido adiposo subcutáneo de pacientes sometidos a cirugía cardíaca, se puede decir que:

- § El tejido adiposo epicárdico expresa niveles menores de catalasa y niveles mayores y/o diferentes modificaciones postraduccionales en otros enzimas anti-oxidantes (GSTP1, PDIA1 y PGAM1) con respecto al tejido adiposo subcutáneo.
- § Los niveles de estrés oxidativo del tejido adiposo epicárdico son mayores que los del tejido adiposo subcutáneo y esta diferencia proviene principalmente de la fracción adipocitaria.
- § Existe una mayor expresión de APOA1 y una menor expresión de FABP4 en tejido adiposo epicárdico de pacientes sometidos a cirugía cardíaca.
- § La actividad secretora del tejido adiposo epicárdico es cuantitativamente mayor, en términos de proteína total, que la del tejido adiposo subcutáneo; lo que se refleja en la mayor secreción de APOA1, GSTP1 y RBP4.

En cuanto al efecto de la presencia de cardiopatía isquémica sobre la expresión y secreción del tejido adiposo epicárdico, se puede concluir que:

- § Se acentúan los cambios observados en las proteínas anti-oxidantes GSTP1, PDIA1 y PGAM1 entre los dos tejidos adiposos.
- § Disminuye la expresión de FABP4 y RBP4 en estos pacientes.
- § El tejido adiposo epicárdico secreta al medio de cultivo niveles menores de APOA1 en pacientes con cardiopatía isquémica.



## BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R. D., R. P. Donahue, W. B. Kannel y P. W. Wilson (1988). "The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. The Framingham Study." **JAMA** 260(23): 3456-60.
- Abel, E. D., S. E. Litwin y G. Sweeney (2008). "Cardiac remodeling in obesity." **Physiol Rev** 88(2): 389-419.
- Adamczak, M., A. Wiecek, T. Funahashi, J. Chudek, F. Kokot y Y. Matsuzawa (2003). "Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension." **Am J Hypertens** 16(1): 72-5.
- Alberti, K. G. y P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." **Diabet Med** 15(7): 539-53.
- Ali, M. K., K. M. Narayan y N. Tandon (2010). "Diabetes & coronary heart disease: current perspectives." **Indian J Med Res** 132(5): 584-97.
- Alvarez-Llamas, G., E. Szalowska, M. P. de Vries, D. Weening, K. Landman, A. Hoek, B. H. Wolffenbuttel, H. Roelofsen y R. J. Vonk (2007). "Characterization of the human visceral adipose tissue secretome." **Mol Cell Proteomics** 6(4): 589-600.
- Amento, E. P., N. Ehsani, H. Palmer y P. Libby (1991). "Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells." **Arterioscler Thromb** 11(5): 1223-30.
- Appenzeller-Herzog, C. y L. Ellgaard (2008). "The human PDI family: versatility packed into a single fold." **Biochim Biophys Acta** 1783(4): 535-48.
- Arora, R. C., M. Waldmann, D. A. Hopkins y J. A. Armour (2003). "Porcine intrinsic cardiac ganglia." **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol** 271(1): 249-58.
- Arsenault, B. J., J. S. Rana, I. Lemieux, J. P. Despres, J. J. Kastelein, S. M. Boekholdt, N. J. Wareham y K. T. Khaw (2010). "Physical inactivity, abdominal obesity and risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women." **Int J Obes (Lond)** 34(2): 340-7.
- Assmann, G., H. Schulte, H. Funke y A. von Eckardstein (1998). "The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease." **Eur Heart J** 19 Suppl M: M8-14.
- Atiar Rahman, M., S. G. Kumar, S. H. Lee, H. S. Hwang, H. A. Kim y J. W. Yun (2008). "Proteome analysis for 3T3-L1 adipocyte differentiation." **J Microbiol Biotechnol** 18(12): 1895-902.
- Austin, M. A., J. E. Hokanson y K. L. Edwards (1998). "Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor." **Am J Cardiol** 81(4A): 7B-12B.
- Avram, A. S., M. M. Avram y W. D. James (2005). "Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue." **J Am Acad Dermatol** 53(4): 671-83.
- Azambuja, A. P., V. Portillo-Sanchez, M. V. Rodrigues, S. V. Omae, D. Schechtman, B. E. Strauss, E. Costanzi-Strauss, J. E. Krieger, J. M. Perez-Pomares y J. Xavier-Neto (2010). "Retinoic acid and VEGF delay smooth muscle relative to endothelial differentiation to coordinate inner and outer coronary vessel wall morphogenesis." **Circ Res** 107(2): 204-16.
- Azfer, A., J. Niu, L. M. Rogers, F. M. Adamski y P. E. Kolattukudy (2006). "Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 291(3): H1411-20.

- Baker, A. R., N. F. Silva, D. W. Quinn, A. L. Harte, D. Pagano, R. S. Bonser, S. Kumar y P. G. McTernan (2006). "Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease." **Cardiovasc Diabetol** 5: 1.
- Balkau, B. y M. A. Charles (1999). "Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)." **Diabet Med** 16(5): 442-3.
- Ball, M. S. y P. Karuso (2007). "Mass spectral compatibility of four proteomics stains." **J Proteome Res** 6(11): 4313-20.
- Barber, M. C., R. J. Ward, S. E. Richards, A. M. Salter, P. J. Buttery, R. G. Vernon y M. T. Travers (2000). "Ovine adipose tissue monounsaturated fat content is correlated to depot-specific expression of the stearoyl-CoA desaturase gene." **J Anim Sci** 78(1): 62-8.
- Basta, G., G. Lazzerini, S. Del Turco, G. M. Ratto, A. M. Schmidt y R. De Caterina (2005). "At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 25(7): 1401-7.
- Basta, G., G. Lazzerini, M. Massaro, T. Simoncini, P. Tanganelli, C. Fu, T. Kislinger, D. M. Stern, A. M. Schmidt y R. De Caterina (2002). "Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses." **Circulation** 105(7): 816-22.
- Baynes, J. W. y S. R. Thorpe (2000). "Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis." **Free Radic Biol Med** 28(12): 1708-16.
- Bays, H., L. Mandarino y R. A. DeFronzo (2004). "Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach." **J Clin Endocrinol Metab** 89(2): 463-78.
- Bencharif, K., L. Hoareau, R. K. Murumalla, E. Tarnus, F. Tallet, R. G. Clerc, C. Gardes, M. Cesari y R. Roche (2010). "Effect of apoA-I on cholesterol release and apoE secretion in human mature adipocytes." **Lipids Health Dis** 9: 75.
- Berg, A. H. y P. E. Scherer (2005). "Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease." **Circ Res** 96(9): 939-49.
- Berggren, K., E. Chernokalskaya, T. H. Steinberg, C. Kemper, M. F. Lopez, Z. Diwu, R. P. Haugland y W. F. Patton (2000). "Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex." **Electrophoresis** 21(12): 2509-21.
- Bigger, J. T., Jr., J. L. Fleiss, R. Kleiger, J. P. Miller y L. M. Rolnitzky (1984). "The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in the 2 years after myocardial infarction." **Circulation** 69(2): 250-8.
- Bobbert, T., J. Raila, F. Schwarz, K. Mai, A. Henze, A. F. Pfeiffer, F. J. Schweigert y J. Spranger (2010). "Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness." **Atherosclerosis** 203(2): 549-51.
- Boord, J. B., K. Maeda, L. Makowski, V. R. Babaev, S. Fazio, M. F. Linton y G. S. Hotamisligil (2002). "Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 22(10): 1686-91.
- Boord, J. B., K. Maeda, L. Makowski, V. R. Babaev, S. Fazio, M. F. Linton y G. S. Hotamisligil (2004). "Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein

deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice." **Circulation** 110(11): 1492-8.

Boring, L., J. Gosling, M. Cleary y I. F. Charo (1998). "Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." **Nature** 394(6696): 894-7.

Bouwman, F. G., M. Claessens, M. A. van Baak, J. P. Noben, P. Wang, W. H. Saris y E. C. Mariman (2009). "The physiologic effects of caloric restriction are reflected in the in vivo adipocyte-enriched proteome of overweight/obese subjects." **J Proteome Res** 8(12): 5532-40.

Bozaoglu, K., K. Bolton, J. McMillan, P. Zimmet, J. Jowett, G. Collier, K. Walder y D. Segal (2007). "Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome." **Endocrinology** 148(10): 4687-94.

Broch, M., R. Ramirez, M. T. Auguet, M. J. Alcaide, C. Aguilar, A. A. Garcia-Espa y C. Richart (2009). "Macrophages are novel sites of expression and regulation of retinol binding protein-4 (RBP4)." **Physiol Res** 59(2): 299-303.

Brook, R. D., R. L. Bard, P. F. Bodary, D. T. Eitzman, S. Rajagopalan, Y. Sun y A. M. Depaoli (2007). "Blood pressure and vascular effects of leptin in humans." **Metab Syndr Relat Disord** 5(3): 270-4.

Cannon, B. y J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." **Physiol Rev** 84(1): 277-359.

Canoy, D., S. M. Boekholdt, N. Wareham, R. Luben, A. Welch, S. Bingham, I. Buchan, N. Day y K. T. Khaw (2007). "Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study." **Circulation** 116(25): 2933-43.

Ceaser, E. K., A. Ramachandran, A. L. Levonen y V. M. Darley-USmar (2003). "Oxidized low-density lipoprotein and 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 increase mitochondrial complex I activity in endothelial cells." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 285(6): H2298-308.

Cinti, S. (2005). "The adipose organ." **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 73(1): 9-15.

Clarke, S. D. y M. K. Armstrong (1989). "Cellular lipid binding proteins: expression, function, and nutritional regulation." **FASEB J** 3(13): 2480-7.

Clinton, S. K., R. Underwood, L. Hayes, M. L. Sherman, D. W. Kufe y P. Libby (1992). "Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis." **Am J Pathol** 140(2): 301-16.

Coe, N. R. y D. A. Bernlohr (1998). "Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins." **Biochim Biophys Acta** 1391(3): 287-306.

Coe, N. R., M. A. Simpson y D. A. Bernlohr (1999). "Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels." **J Lipid Res** 40(5): 967-72.

Company, J. M., F. W. Booth, M. H. Laughlin, A. A. Arce-Esquivel, H. S. Sacks, S. W. Bahouth y J. N. Fain (2010). "Epicardial fat gene expression after aerobic exercise training in pigs with coronary atherosclerosis: relationship to visceral and subcutaneous fat." **J Appl Physiol** 109(6): 1904-12.

Cook, K. S., H. Y. Min, D. Johnson, R. J. Chaplinsky, J. S. Flier, C. R. Hunt y B. M. Spiegelman (1987). "Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve." **Science** 237(4813): 402-5.

- Corradi, D., R. Maestri, S. Callegari, P. Pastori, M. Goldoni, T. V. Luong y C. Bordi (2004). "The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts." **Cardiovasc Pathol** 13(6): 313-6.
- Corton, M., J. I. Botella-Carretero, J. A. Lopez, E. Camafeita, J. L. San Millan, H. F. Escobar-Morreale y B. Peral (2008). "Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry." **Hum Reprod** 23(3): 651-61.
- Couillard, C., B. Lamarche, A. Tchernof, D. Prud'homme, A. Tremblay, C. Bouchard, S. Moorjani, A. Nadeau, P. J. Lupien y J. P. Despres (1996). "Plasma high-density lipoprotein cholesterol but not apolipoprotein A-I is a good correlate of the visceral obesity-insulin resistance dyslipidemic syndrome." **Metabolism** 45(7): 882-8.
- Cox, J. y M. Mann (2007). "Is proteomics the new genomics?" **Cell** 130(3): 395-8.
- Chang, Y. H., C. C. Wu, K. P. Chang, J. S. Yu, Y. C. Chang y P. C. Liao (2009). "Cell secretome analysis using hollow fiber culture system leads to the discovery of CLIC1 protein as a novel plasma marker for nasopharyngeal carcinoma." **J Proteome Res** 8(12): 5465-74.
- Chaowalit, N. y F. Lopez-Jimenez (2008). "Epicardial adipose tissue: friendly companion or hazardous neighbour for adjacent coronary arteries?" **Eur Heart J** 29(6): 695-7.
- Chaowalit, N., V. K. Somers, P. A. Pellikka, C. S. Rihal y F. Lopez-Jimenez (2006). "Subepicardial adipose tissue and the presence and severity of coronary artery disease." **Atherosclerosis** 186(2): 354-9.
- Chaowalit, N., V. K. Somers, P. A. Pellikka, C. S. Rihal y F. Lopez-Jimenez (2007). "Adipose tissue of atrial septum as a marker of coronary artery disease." **Chest** 132(3): 817-22.
- Chatterjee, T. K., L. L. Stoll, G. M. Denning, A. Harrelson, A. L. Blomkalns, G. Idelman, F. G. Rothenberg, B. Neltner, S. A. Romig-Martin, E. W. Dickson, S. Rudich y N. L. Weintraub (2009). "Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding." **Circ Res** 104(4): 541-9.
- Cheng, K. H., C. S. Chu, K. T. Lee, T. H. Lin, C. C. Hsieh, C. C. Chiu, W. C. Voon, S. H. Sheu y W. T. Lai (2008). "Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease." **Int J Obes (Lond)** 32(2): 268-74.
- Cheng, V. Y., D. Dey, B. Tamarappoo, R. Nakazato, H. Gransar, R. Miranda-Peats, A. Ramesh, N. D. Wong, L. J. Shaw, P. J. Slomka y D. S. Berman (2010). "Pericardial fat burden on ECG-gated noncontrast CT in asymptomatic patients who subsequently experience adverse cardiovascular events." **JACC Cardiovasc Imaging** 3(4): 352-60.
- Choi, K. M., J. S. Lee, E. J. Kim, S. H. Baik, H. S. Seo, D. S. Choi, D. J. Oh y C. G. Park (2008). "Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease." **Eur J Endocrinol** 158(2): 203-7.
- D'Onofrio, C., V. Colantuoni y R. Cortese (1985). "Structure and cell-specific expression of a cloned human retinol binding protein gene: the 5'-flanking region contains hepatoma specific transcriptional signals." **EMBO J** 4(8): 1981-9.
- Dagenais, G. R., Q. Yi, J. F. Mann, J. Bosch, J. Pogue y S. Yusuf (2005). "Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease." **Am Heart J** 149(1): 54-60.
- Damcott, C. M., S. P. Moffett, E. Feingold, M. M. Barmada, J. A. Marshall, R. F. Hamman y R. E. Ferrell (2004). "Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and



peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males." **Metabolism** 53(3): 303-9.

Darvall, K. A., R. C. Sam, S. H. Silverman, A. W. Bradbury y D. J. Adam (2007). "Obesity and thrombosis." **Eur J Vasc Endovasc Surg** 33(2): 223-33.

De Matteis, R., D. Ricquier y S. Cinti (1998). "TH-, NPY-, SP-, and CGRP-immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study." **J Neurocytol** 27(12): 877-86.

de Vos, A. M., M. Prokop, C. J. Roos, M. F. Meijis, Y. T. van der Schouw, A. Rutten, P. M. Gorter, M. J. Cramer, P. A. Doevendans, B. J. Rensing, M. L. Bartelink, B. K. Velthuis, A. Mosterd y M. L. Bots (2008). "Peri-coronary epicardial adipose tissue is related to cardiovascular risk factors and coronary artery calcification in postmenopausal women." **Eur Heart J** 29(6): 777-83.

DeForge, L. E., A. M. Preston, E. Takeuchi, J. Kenney, L. A. Boxer y D. G. Remick (1993). "Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress." **J Biol Chem** 268(34): 25568-76.

Demer, L. L. y Y. Tintut (2008). "Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease." **Circulation** 117(22): 2938-48.

Despres, J. P., I. Lemieux, J. Bergeron, P. Pibarot, P. Mathieu, E. Larose, J. Rodes-Cabau, O. F. Bertrand y P. Poirier (2008). "Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 28(6): 1039-49.

Ding, J., F. C. Hsu, T. B. Harris, Y. Liu, S. B. Kritchevsky, M. Szklo, P. Ouyang, M. A. Espeland, K. K. Lohman, M. H. Criqui, M. Allison, D. A. Bluemke y J. J. Carr (2009). "The association of pericardial fat with incident coronary heart disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." **Am J Clin Nutr** 90(3): 499-504.

Dowell, J. A., J. A. Johnson y L. Li (2009). "Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics." **J Proteome Res** 8(8): 4135-43.

Dulhunty, A., P. Gage, S. Curtis, G. Chelvanayagam y P. Board (2001). "The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator." **J Biol Chem** 276(5): 3319-23.

Dutour, A., V. Achard, H. Sell, N. Naour, F. Collart, B. Gaborit, A. Silaghi, J. Eckel, M. C. Alessi, C. Henegar y K. Clement (2010). "Secretory Type II Phospholipase A2 Is Produced and Secreted by Epicardial Adipose Tissue and Overexpressed in Patients with Coronary Artery Disease." **J Clin Endocrinol Metab** 95(2): 963-7.

Dyer, D. G., J. A. Dunn, S. R. Thorpe, K. E. Bailie, T. J. Lyons, D. R. McCance y J. W. Baynes (1993). "Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging." **J Clin Invest** 91(6): 2463-9.

Eid, H., D. M. Larson, J. P. Springhorn, M. A. Attawia, R. C. Nayak, T. W. Smith y R. A. Kelly (1992). "Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture." **Circ Res** 71(1): 40-50.

Eiras, S., E. Teijeira-Fernandez, A. Salgado-Somoza, E. Couso, T. Garcia-Caballero, J. Sierra y J. R. Juanatey (2010). "Relationship between epicardial adipose tissue adipocyte size and MCP-1 expression." **Cytokine** 51(2): 207-12.

Eiras, S., E. Teijeira-Fernandez, L. G. Shamagian, A. L. Fernandez, A. Vazquez-Boquete y J. R. Gonzalez-Juanatey (2008). "Extension of coronary artery disease is

associated with increased IL-6 and decreased adiponectin gene expression in epicardial adipose tissue." **Cytokine** 43(2): 174-80.

Elshourbagy, N. A., M. S. Boguski, W. S. Liao, L. S. Jefferson, J. I. Gordon y J. M. Taylor (1985). "Expression of rat apolipoprotein A-IV and A-I genes: mRNA induction during development and in response to glucocorticoids and insulin." **Proc Natl Acad Sci U S A** 82(23): 8242-6.

Eralp, I., H. Lie-Venema, N. A. Bax, M. C. Wijffels, A. Van Der Laarse, M. C. Deruiter, A. J. Bogers, N. M. Van Den Akker, R. G. Gourdie, M. J. Schalij, R. E. Poelmann y A. C. Gittenberger-De Groot (2006). "Epicardium-derived cells are important for correct development of the Purkinje fibers in the avian heart." **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol** 288(12): 1272-80.

Fain, J. N., A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema y S. W. Bahouth (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." **Endocrinology** 145(5): 2273-82.

Fain, J. N., H. S. Sacks, S. W. Bahouth, D. S. Tichansky, A. K. Madan y P. S. Cheema (2010). "Human epicardial adipokine messenger RNAs: comparisons of their expression in substernal, subcutaneous, and omental fat." **Metabolism** 59(9): 1379-86.

Fearon, I. M. y S. P. Faux (2009). "Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight." **J Mol Cell Cardiol** 47(3): 372-81.

Flint, A. J., F. B. Hu, R. J. Glynn, H. Caspard, J. E. Manson, W. C. Willett y E. B. Rimm (2010). "Excess weight and the risk of incident coronary heart disease among men and women." **Obesity (Silver Spring)** 18(2): 377-83.

Florvall, G., S. Basu y A. Larsson (2006). "Apolipoprotein A1 is a stronger prognostic marker than are HDL and LDL cholesterol for cardiovascular disease and mortality in elderly men." **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 61(12): 1262-6.

Forkink, M., J. A. Smeitink, R. Brock, P. H. Willems y W. J. Koopman (2010). "Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells." **Biochim Biophys Acta** 1797(6-7): 1034-44.

Fox, C. S., J. M. Massaro, U. Hoffmann, K. M. Pou, P. Maurovich-Horvat, C. Y. Liu, R. S. Vasan, J. M. Murabito, J. B. Meigs, L. A. Cupples, R. B. D'Agostino, Sr. y C. J. O'Donnell (2007). "Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study." **Circulation** 116(1): 39-48.

Frangos, S. G., V. Gahtan y B. Sumpio (1999). "Localization of atherosclerosis: role of hemodynamics." **Arch Surg** 134(10): 1142-9.

Frayn, K. N., F. Karpe, B. A. Fielding, I. A. Macdonald y S. W. Coppel (2003). "Integrative physiology of human adipose tissue." **Int J Obes Relat Metab Disord** 27(8): 875-88.

Fried, S. K., D. A. Bunkin y A. S. Greenberg (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." **J Clin Endocrinol Metab** 83(3): 847-50.

Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M. Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa y I. Shimomura (2005). "Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin." **Science** 307(5708): 426-30.

Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M.

- Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa y I. Shimomura (2007). "Retraction." **Science** 318(5850): 565.
- Furuhashi, M., G. Tuncman, C. Z. Gorgun, L. Makowski, G. Atsumi, E. Vaillancourt, K. Kono, V. R. Babaev, S. Fazio, M. F. Linton, R. Sulsky, J. A. Robl, R. A. Parker y G. S. Hotamisligil (2007). "Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2." **Nature** 447(7147): 959-65.
- Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda y I. Shimomura (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." **J Clin Invest** 114(12): 1752-61.
- Galic, S., J. S. Oakhill y G. R. Steinberg (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." **Mol Cell Endocrinol** 316(2): 129-39.
- Garcia Garcia, J., J. A. Serrano Sanchez, S. del Castillo Arrojo, J. L. Cantalapiedra Alsedo, J. Villacastin, J. Almendral, A. Arenal, S. Gonzalez y J. L. Delcan Dominguez (2000). "[Predictors of sudden death in coronary artery disease]." **Rev Esp Cardiol** 53(3): 440-62.
- Garruti, G. y D. Ricquier (1992). "Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans." **Int J Obes Relat Metab Disord** 16(5): 383-90.
- Gastaldelli, A. y G. Basta (2010). "Ectopic fat and cardiovascular disease: what is the link?" **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 20(7): 481-90.
- Goralski, K. B., T. C. McCarthy, E. A. Hanniman, B. A. Zabel, E. C. Butcher, S. D. Parlee, S. Muruganandan y C. J. Sinal (2007). "Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism." **J Biol Chem** 282(38): 28175-88.
- Gordon, T., W. P. Castelli, M. C. Hjortland, W. B. Kannel y T. R. Dawber (1977). "High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study." **Am J Med** 62(5): 707-14.
- Gorter, P. M., A. M. de Vos, Y. van der Graaf, P. R. Stella, P. A. Doevendans, M. F. Meijis, M. Prokop y F. L. Visseren (2008). "Relation of epicardial and pericoronary fat to coronary atherosclerosis and coronary artery calcium in patients undergoing coronary angiography." **Am J Cardiol** 102(4): 380-5.
- Goth, L. y J. W. Eaton (2000). "Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes." **Lancet** 356(9244): 1820-1.
- Goto, S., M. Kawakatsu, S. Izumi, Y. Urata, K. Kageyama, Y. Ihara, T. Koji y T. Kondo (2009). "Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress." **Free Radic Biol Med** 46(10): 1392-403.
- Gotto, A. M., Jr. y S. M. Grundy (1999). "Lowering LDL cholesterol: questions from recent meta-analyses and subset analyses of clinical trial DataIssues from the Interdisciplinary Council on Reducing the Risk for Coronary Heart Disease, ninth Council meeting." **Circulation** 99(8): E1-7.
- Graham, T. E. y B. B. Kahn (2007). "Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes." **Horm Metab Res** 39(10): 717-21.
- Gray, D. S., K. Fujioka, P. M. Colletti, H. Kim, W. Devine, T. Cuyegkeng y T. Pappas (1991). "Magnetic-resonance imaging used for determining fat distribution in obesity and diabetes." **Am J Clin Nutr** 54(4): 623-7.
- Greenberg, A. S., R. P. Nordan, J. McIntosh, J. C. Calvo, R. O. Scow y D. Jablons (1992). "Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in

vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia." **Cancer Res** 52(15): 4113-6.

Gregoire, F. M., C. M. Smas y H. S. Sul (1998). "Understanding adipocyte differentiation." **Physiol Rev** 78(3): 783-809.

Griendling, K. K. y G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies." **Circulation** 108(17): 2034-40.

Grundey, S. M., J. I. Cleeman, S. R. Daniels, K. A. Donato, R. H. Eckel, B. A. Franklin, D. J. Gordon, R. M. Krauss, P. J. Savage, S. C. Smith, Jr., J. A. Spertus y F. Costa (2005). "Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement." **Circulation** 112(17): 2735-52.

Haffner, S. M., S. Lehto, T. Ronnemaa, K. Pyorala y M. Laakso (1998). "Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction." **N Engl J Med** 339(4): 229-34.

Harris, L. R., M. A. Churchward, R. H. Butt y J. R. Coorsen (2007). "Assessing detection methods for gel-based proteomic analyses." **J Proteome Res** 6(4): 1418-25.

Hartog, J. W., A. A. Voors, S. J. Bakker, A. J. Smit y D. J. van Veldhuisen (2007). "Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications." **Eur J Heart Fail** 9(12): 1146-55.

He, J. y P. K. Whelton (1999). "Elevated systolic blood pressure and risk of cardiovascular and renal disease: overview of evidence from observational epidemiologic studies and randomized controlled trials." **Am Heart J** 138(3 Pt 2): 211-9.

Hertzel, A. V. y D. A. Bernlohr (2000). "The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function." **Trends Endocrinol Metab** 11(5): 175-80.

Hida, K., J. Wada, J. Eguchi, H. Zhang, M. Baba, A. Seida, I. Hashimoto, T. Okada, A. Yasuhara, A. Nakatsuka, K. Shikata, S. Hourai, J. Futami, E. Watanabe, Y. Matsuki, R. Hiramatsu, S. Akagi, H. Makino y Y. S. Kanwar (2005). "Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity." **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(30): 10610-5.

Himms-Hagen, J. (2001). "Does brown adipose tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity?" **Rev Endocr Metab Disord** 2(4): 395-401.

Hink, U., H. Li, H. Mollnau, M. Oelze, E. Matheis, M. Hartmann, M. Skatchkov, F. Thaiss, R. A. Stahl, A. Warnholtz, T. Meinertz, K. Griendling, D. G. Harrison, U. Forstermann y T. Munzel (2001). "Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus." **Circ Res** 88(2): E14-22.

Hirakow, R. (1992). "Epicardial formation in staged human embryos." **Kaibogaku Zasshi** 67(5): 616-22.

Ho, Y. S., Y. Xiong, W. Ma, A. Spector y D. S. Ho (2004). "Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury." **J Biol Chem** 279(31): 32804-12.

Hocking, S. L., L. E. Wu, M. Guilhaus, D. J. Chisholm y D. E. James (2010). "Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells." **Diabetes** 59(12): 3008-16.

Hopkins, G. J. y P. J. Barter (1986). "Role of triglyceride-rich lipoproteins and hepatic lipase in determining the particle size and composition of high density lipoproteins." **J Lipid Res** 27(12): 1265-77.

- Horowitz, J. F. y S. Klein (2000). "Whole body and abdominal lipolytic sensitivity to epinephrine is suppressed in upper body obese women." **Am J Physiol Endocrinol Metab** 278(6): E1144-52.
- Horton, D. B., P. Libby y U. Schonbeck (2001). "Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity." **Ann N Y Acad Sci** 947: 329-36.
- Hotamisligil, G. S. (2000). "Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte." **Int J Obes Relat Metab Disord** 24 Suppl 4: S23-7.
- Hu, E., P. Liang y B. M. Spiegelman (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." **J Biol Chem** 271(18): 10697-703.
- Huang, P. L. (2009). "A comprehensive definition for metabolic syndrome." **Dis Model Mech** 2(5-6): 231-7.
- Hulley, S., D. Grady, T. Bush, C. Furberg, D. Herrington, B. Riggs y E. Vittinghoff (1998). "Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group." **JAMA** 280(7): 605-13.
- Hulley, S. B., R. H. Rosenman, R. D. Bawol y R. J. Brand (1980). "Epidemiology as a guide to clinical decisions. The association between triglyceride and coronary heart disease." **N Engl J Med** 302(25): 1383-9.
- Huxley, R., S. Mendis, E. Zheleznyakov, S. Reddy y J. Chan (2010). "Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk--a review of the literature." **Eur J Clin Nutr** 64(1): 16-22.
- Iacobellis, G. (2005). "Imaging of visceral adipose tissue: an emerging diagnostic tool and therapeutic target." **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord** 5(4): 345-53.
- Iacobellis, G., F. Assael, M. C. Ribaudo, A. Zappaterreno, G. Alessi, U. Di Mario y F. Leonetti (2003). "Epicardial fat from echocardiography: a new method for visceral adipose tissue prediction." **Obes Res** 11(2): 304-10.
- Iacobellis, G., D. Corradi y A. M. Sharma (2005). "Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart." **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** 2(10): 536-43.
- Iacobellis, G., D. Pistilli, M. Gucciardo, F. Leonetti, F. Miraldi, G. Brancaccio, P. Gallo y C. R. di Gioia (2005). "Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease." **Cytokine** 29(6): 251-5.
- Iacobellis, G., M. C. Ribaudo, A. Zappaterreno, C. V. Iannucci y F. Leonetti (2004). "Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass." **Am J Cardiol** 94(8): 1084-7.
- Iglesias, M. J., S. Eiras, R. Pineiro, D. Lopez-Otero, R. Gallego, A. L. Fernandez, F. Lago y J. R. Gonzalez-Juanatey (2006). "[Gender differences in adiponectin and leptin expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery]." **Rev Esp Cardiol** 59(12): 1252-60.
- Ikemura, M., M. Nishikawa, K. Hyoudou, Y. Kobayashi, F. Yamashita y M. Hashida (2010). "Improvement of insulin resistance by removal of systemic hydrogen peroxide by PEGylated catalase in obese mice." **Mol Pharm** 7(6): 2069-76.
- Iozzo, P., R. Lautamaki, R. Borra, H. R. Lehto, M. Bucci, A. Viljanen, J. Parkka, V. Lepomaki, R. Maggio, R. Parkkola, J. Knuuti y P. Nuutila (2009). "Contribution of glucose tolerance and gender to cardiac adiposity." **J Clin Endocrinol Metab** 94(11): 4472-82.

- Ismail, N. A., M. Z. Alavi y S. Moore (1994a). "Isolation of lipoprotein-proteoglycan complexes from balloon catheter deendothelialized aortas and the uptake of these complexes by blood monocyte-derived macrophages." **Pathology** 26(2): 145-53.
- Ismail, N. A., M. Z. Alavi y S. Moore (1994b). "Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells." **Atherosclerosis** 105(1): 79-87.
- Jacobs, D. R., Jr., I. L. Mebane, S. I. Bangdiwala, M. H. Criqui y H. A. Tyroler (1990). "High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study." **Am J Epidemiol** 131(1): 32-47.
- Jezek, P., M. Zackova, M. Ruzicka, E. Skobisova y M. Jaburek (2004). "Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies." **Physiol Res** 53 Suppl 1: S199-211.
- Jin, J., D. Q. Peng, S. G. Yuan, S. P. Zhao, X. H. Ning, S. H. Wang y S. L. Li (2010). "Serum adipocyte fatty acid binding proteins and adiponectin in patients with coronary artery disease: The significance of A-FABP/adiponectin ratio." **Clin Chim Acta** 411(21-22): 1761-5.
- Joyner, M. J. (2000). "Effect of exercise on arterial compliance." **Circulation** 102(11): 1214-5.
- Kabanova, S., P. Kleinbongard, J. Volkmer, B. Andree, M. Kelm y T. W. Jax (2009). "Gene expression analysis of human red blood cells." **Int J Med Sci** 6(4): 156-9.
- Keaney, J. F., Jr., M. G. Larson, R. S. Vasan, P. W. Wilson, I. Lipinska, D. Corey, J. M. Massaro, P. Sutherland, J. A. Vita y E. J. Benjamin (2003). "Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 23(3): 434-9.
- Keegan, J., P. D. Gatehouse, G. Z. Yang y D. N. Firmin (2004). "Spiral phase velocity mapping of left and right coronary artery blood flow: correction for through-plane motion using selective fat-only excitation." **J Magn Reson Imaging** 20(6): 953-60.
- Keller, M., A. Ruegg, S. Werner y H. D. Beer (2008). "Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion." **Cell** 132(5): 818-31.
- Kenchiah, S., J. C. Evans, D. Levy, P. W. Wilson, E. J. Benjamin, M. G. Larson, W. B. Kannel y R. S. Vasan (2002). "Obesity and the risk of heart failure." **N Engl J Med** 347(5): 305-13.
- Kern, P. A., S. Ranganathan, C. Li, L. Wood y G. Ranganathan (2001). "Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance." **Am J Physiol Endocrinol Metab** 280(5): E745-51.
- Kershaw, E. E. y J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." **J Clin Endocrinol Metab** 89(6): 2548-56.
- Kersten, S., B. Desvergne y W. Wahli (2000). "Roles of PPARs in health and disease." **Nature** 405(6785): 421-4.
- Ketonen, J., J. Shi, E. Martonen y E. Mervaala (2010). "Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice." **Circ J** 74(7): 1479-87.
- Kim, S. y N. Moustaid-Moussa (2000). "Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte." **J Nutr** 130(12): 3110S-3115S.
- Kirk, E. P. y S. Klein (2009). "Pathogenesis and pathophysiology of the cardiometabolic syndrome." **J Clin Hypertens (Greenwich)** 11(12): 761-5.
- Kirkman, H. N. y G. F. Gaetani (2007). "Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries." **Trends Biochem Sci** 32(1): 44-50.

- Klingenberg, M. y S. G. Huang (1999). "Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue." **Biochim Biophys Acta** 1415(2): 271-96.
- Kloting, N., J. Berndt, S. Kralisch, P. Kovacs, M. Fasshauer, M. R. Schon, M. Stumvoll y M. Bluher (2006). "Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes." **Biochem Biophys Res Commun** 339(1): 430-6.
- Kloting, N., T. E. Graham, J. Berndt, S. Kralisch, P. Kovacs, C. J. Wason, M. Fasshauer, M. R. Schon, M. Stumvoll, M. Bluher y B. B. Kahn (2007). "Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass." **Cell Metab** 6(1): 79-87.
- Komiyama, M., K. Ito y Y. Shimada (1987). "Origin and development of the epicardium in the mouse embryo." **Anat Embryol (Berl)** 176(2): 183-9.
- Kondoh, H., M. E. Lleonart, D. Bernard y J. Gil (2007). "Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization." **Histol Histopathol** 22(1): 85-90.
- Kong, J. Y. y S. W. Rabkin (2000). "Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A." **Biochim Biophys Acta** 1485(1): 45-55.
- Kong, J. Y. y S. W. Rabkin (2002). "Palmitate-induced cardiac apoptosis is mediated through CPT-1 but not influenced by glucose and insulin." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 282(2): H717-25.
- Konishi, M., S. Sugiyama, K. Sugamura, T. Nozaki, K. Ohba, J. Matsubara, Y. Matsuzawa, H. Sumida, Y. Nagayoshi, T. Nakaura, K. Awai, Y. Yamashita, H. Jinnouchi, K. Matsui, K. Kimura, S. Umemura y H. Ogawa (2010). "Association of pericardial fat accumulation rather than abdominal obesity with coronary atherosclerotic plaque formation in patients with suspected coronary artery disease." **Atherosclerosis** 209(2): 573-8.
- Kratchmarova, I., D. E. Kalume, B. Blagoev, P. E. Scherer, A. V. Podtelejnikov, H. Molina, P. E. Bickel, J. S. Andersen, M. M. Fernandez, J. Bunkenborg, P. Roepstorff, K. Kristiansen, H. F. Lodish, M. Mann y A. Pandey (2002). "A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes." **Mol Cell Proteomics** 1(3): 213-22.
- Kremen, J., M. Dolinkova, J. Krajickova, J. Blaha, K. Anderlova, Z. Lacinova, D. Haluzikova, L. Bosanska, M. Vokurka, S. Svacina y M. Haluzik (2006). "Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance." **J Clin Endocrinol Metab** 91(11): 4620-7.
- Kroning, H., T. Kahne, A. Ittenson, A. Franke y S. Ansorge (1994). "Thiol-proteindisulfide-oxidoreductase (proteindisulfide isomerase): a new plasma membrane constituent of mature human B lymphocytes." **Scand J Immunol** 39(4): 346-50.
- Laaksonen, D. E., H. M. Lakka, L. K. Niskanen, G. A. Kaplan, J. T. Salonen y T. A. Lakka (2002). "Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study." **Am J Epidemiol** 156(11): 1070-7.
- Lakatta, E. G. (1987). "Do hypertension and aging have a similar effect on the myocardium?" **Circulation** 75(1 Pt 2): I69-77.
- Lakatta, E. G. (2000). "Cardiovascular aging in health." **Clin Geriatr Med** 16(3): 419-44.

- Langheim, S., L. Dreas, L. Veschini, F. Maisano, C. Foglieni, S. Ferrarello, G. Sinagra, B. Zingone, O. Alfieri, E. Ferrero, A. Maseri y G. Ruotolo (2010). "Increased expression and secretion of resistin in epicardial adipose tissue of patients with acute coronary syndrome." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 298(3): H746-53.
- Langin, D., C. Holm y M. Lafontan (1996). "Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism." **Proc Nutr Soc** 55(1B): 93-109.
- Lanne, B. y O. Panfilov (2005). "Protein staining influences the quality of mass spectra obtained by peptide mass fingerprinting after separation on 2-d gels. A comparison of staining with coomassie brilliant blue and sypro ruby." **J Proteome Res** 4(1): 175-9.
- Lanne, B., F. Potthast, A. Hoglund, H. Brockenhuus von Lowenhielm, A. C. Nystrom, F. Nilsson y B. Dahllof (2001). "Thiourea enhances mapping of the proteome from murine white adipose tissue." **Proteomics** 1(7): 819-28.
- Large, V., O. Peroni, D. Letexier, H. Ray y M. Beylot (2004). "Metabolism of lipids in human white adipocyte." **Diabetes Metab** 30(4): 294-309.
- Larsson, B., K. Svardsudd, L. Welin, L. Wilhelmsen, P. Bjorntorp y G. Tibblin (1984). "Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913." **Br Med J (Clin Res Ed)** 288(6428): 1401-4.
- Lee, S. S. y T. L. Wu (1972). "The role of the mural coronary artery in prevention of coronary atherosclerosis." **Arch Pathol** 93(1): 32-5.
- Lemieux, I., A. Pascot, D. Prud'homme, N. Almeras, P. Bogaty, A. Nadeau, J. Bergeron y J. P. Despres (2001). "Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 21(6): 961-7.
- Leney, S. E. y J. M. Tavaré (2009). "The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets." **J Endocrinol** 203(1): 1-18.
- Li, S. Y., Y. Liu, V. K. Sigmon, A. McCort y J. Ren (2005). "High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis." **Diabetes Obes Metab** 7(4): 448-54.
- Libby, P. (2006). "Inflammation and cardiovascular disease mechanisms." **Am J Clin Nutr** 83(2): 456S-460S.
- Libby, P. (2008). "The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis." **J Intern Med** 263(5): 517-27.
- Libby, P., P. M. Ridker y A. Maseri (2002). "Inflammation and atherosclerosis." **Circulation** 105(9): 1135-43.
- Libby, P. y P. Theroux (2005). "Pathophysiology of coronary artery disease." **Circulation** 111(25): 3481-8.
- Lin, C. C., M. M. Lai, T. C. Li, C. I. Li, C. S. Liu, C. C. Chen y M. T. Wu (2009). "Relationship between serum retinol-binding protein 4 and visfatin and the metabolic syndrome." **Diabetes Res Clin Pract** 85(1): 24-9.
- Lionetti, L., M. P. Mollica, A. Lombardi, G. Cavaliere, G. Gifuni y A. Barletta (2009). "From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation." **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 19(2): 146-52.
- Lo, S. K., K. Janakidevi, L. Lai y A. B. Malik (1993). "Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation." **Am J Physiol** 264(4 Pt 1): L406-12.



- Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal y W. C. Stanley (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." **Physiol Rev** 90(1): 207-58.
- Lopez-Jimenez, F. y M. Cortes-Bergoderi (2011). "Obesity and the Heart." **Rev Esp Cardiol** 64(2): 140-149.
- Lopez-Jimenez, F., F. H. Sert Kuniyoshi, A. Gami y V. K. Somers (2008). "Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease." **Chest** 133(3): 793-804.
- Lowell, B. B. (1999). "PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function." **Cell** 99(3): 239-42.
- Lowell, B. B. y B. M. Spiegelman (2000). "Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis." **Nature** 404(6778): 652-60.
- Luc, G., J. P. Empana, P. Morange, I. Juhan-Vague, D. Arveiler, J. Ferrieres, P. Amouyel, A. Evans, F. Kee, A. Bingham, E. Machez y P. Ducimetiere (2010). "Adipocytokines and the risk of coronary heart disease in healthy middle aged men: the PRIME Study." **Int J Obes (Lond)** 34(1): 118-26.
- Luo, S., N. B. Wehr y R. L. Levine (2006). "Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green." **Anal Biochem** 350(2): 233-8.
- Lloyd-Jones, D. M., B. H. Nam, R. B. D'Agostino, Sr., D. Levy, J. M. Murabito, T. J. Wang, P. W. Wilson y C. J. O'Donnell (2004). "Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring." **JAMA** 291(18): 2204-11.
- Mach, F., A. Sauty, A. S. Iarossi, G. K. Sukhova, K. Neote, P. Libby y A. D. Luster (1999). "Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells." **J Clin Invest** 104(8): 1041-50.
- Mach, F., U. Schonbeck, J. Y. Bonnefoy, J. S. Pober y P. Libby (1997). "Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor." **Circulation** 96(2): 396-9.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa y K. Matsubara (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." **Biochem Biophys Res Commun** 221(2): 286-9.
- Mahabadi, A. A., J. M. Massaro, G. A. Rosito, D. Levy, J. M. Murabito, P. A. Wolf, C. J. O'Donnell, C. S. Fox y U. Hoffmann (2009). "Association of pericardial fat, intrathoracic fat, and visceral abdominal fat with cardiovascular disease burden: the Framingham Heart Study." **Eur Heart J** 30(7): 850-6.
- Makowski, L., J. B. Boord, K. Maeda, V. R. Babaev, K. T. Uysal, M. A. Morgan, R. A. Parker, J. Suttles, S. Fazio, G. S. Hotamisligil y M. F. Linton (2001). "Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis." **Nat Med** 7(6): 699-705.
- Malhotra, J. D. y R. J. Kaufman (2007). "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?" **Antioxid Redox Signal** 9(12): 2277-93.
- Manner, J. (1999). "Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium." **Anat Rec** 255(2): 212-26.

- Manner, J., J. M. Perez-Pomares, D. Macias y R. Munoz-Chapuli (2001). "The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review." **Cells Tissues Organs** 169(2): 89-103.
- Marchington, J. M., C. A. Mattacks y C. M. Pond (1989). "Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties." **Comp Biochem Physiol B** 94(2): 225-32.
- Marchington, J. M. y C. M. Pond (1990). "Site-specific properties of pericardial and epicardial adipose tissue: the effects of insulin and high-fat feeding on lipogenesis and the incorporation of fatty acids in vitro." **Int J Obes** 14(12): 1013-22.
- Marin, P., B. Andersson, M. Ottosson, L. Olbe, B. Chowdhury, H. Kvist, G. Holm, L. Sjostrom y P. Bjorntorp (1992). "The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men." **Metabolism** 41(11): 1242-8.
- Maron, D. J., S. Fazio y M. F. Linton (2000). "Current perspectives on statins." **Circulation** 101(2): 207-13.
- Martinet, W., M. W. Knaapen, G. R. De Meyer, A. G. Herman y M. M. Kockx (2001). "Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering." **Circ Res** 88(7): 733-9.
- Mas, V. R., R. A. Fisher, K. J. Archer y D. G. Maluf (2009). "Proteomics and liver fibrosis: identifying markers of fibrogenesis." **Expert Rev Proteomics** 6(4): 421-31.
- Mathieu, P., P. Poirier, P. Pibarot, I. Lemieux y J. P. Despres (2009). "Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease." **Hypertension** 53(4): 577-84.
- Mazurek, T., L. Zhang, A. Zalewski, J. D. Mannion, J. T. Diehl, H. Arafat, L. Sarov-Blat, S. O'Brien, E. A. Keiper, A. G. Johnson, J. Martin, B. J. Goldstein y Y. Shi (2003). "Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators." **Circulation** 108(20): 2460-6.
- Mead, J. R., S. A. Irvine y D. P. Ramji (2002). "Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease." **J Mol Med** 80(12): 753-69.
- Miettinen, H., S. Lehto, V. Salomaa, M. Mahonen, M. Niemela, S. M. Haffner, K. Pyorala y J. Tuomilehto (1998). "Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group." **Diabetes Care** 21(1): 69-75.
- Miyata, T., S. Sugiyama, A. Saito y K. Kurokawa (2001). "Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress")." **Kidney Int Suppl** 78: S25-31.
- Mohamed-Ali, V., S. Goodrick, A. Rawesh, D. R. Katz, J. M. Miles, J. S. Yudkin, S. Klein y S. W. Coppack (1997). "Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo." **J Clin Endocrinol Metab** 82(12): 4196-200.
- Muñoz-Chapuli, R., D. Macias, M. Gonzalez-Iriarte, R. Carmona, G. Atencia y J. M. Perez-Pomares (2002). "[The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development]." **Rev Esp Cardiol** 55(10): 1070-82.
- Napolitano, L. (1963). "The Differentiation of White Adipose Cells. An Electron Microscope Study." **J Cell Biol** 18: 663-79.
- Napolitano, L. y D. Fawcett (1958). "The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat." **J Biophys Biochem Cytol** 4(6): 685-92.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube y W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." **Electrophoresis** 9(6): 255-62.

- Nickel, W. (2010). "Pathways of unconventional protein secretion." **Curr Opin Biotechnol** 21(5): 621-6.
- Nicod, P., E. Gilpin, H. Dittrich, F. Chappuis, S. Ahnve, R. Engler, H. Henning y J. Ross, Jr. (1988). "Influence on prognosis and morbidity of left ventricular ejection fraction with and without signs of left ventricular failure after acute myocardial infarction." **Am J Cardiol** 61(15): 1165-71.
- Nichols, W. W., M. F. O'Rourke, A. P. Avolio, T. Yaginuma, J. P. Murgo, C. J. Pepine y C. R. Conti (1985). "Effects of age on ventricular-vascular coupling." **Am J Cardiol** 55(9): 1179-84.
- Nievelstein, P. F., A. M. Fogelman, G. Mottino y J. S. Frank (1991). "Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue." **Arterioscler Thromb** 11(6): 1795-805.
- Noiva, R. (1999). "Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum." **Semin Cell Dev Biol** 10(5): 481-93.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." **J Biol Chem** 250(10): 4007-21.
- Oberkofler, H., G. Dallinger, Y. M. Liu, E. Hell, F. Krempler y W. Patsch (1997). "Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans." **J Lipid Res** 38(10): 2125-33.
- Okuno, Y., M. Matsuda, H. Kobayashi, K. Morita, E. Suzuki, A. Fukuhara, R. Komuro, M. Shimabukuro y I. Shimomura (2008). "Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region." **Biochem Biophys Res Commun** 366(3): 698-704.
- Ong, S. E. y M. Mann (2005). "Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative." **Nat Chem Biol** 1(5): 252-62.
- Oram, J. F. (2000). "Tangier disease and ABCA1." **Biochim Biophys Acta** 1529(1-3): 321-30.
- Ost, A., A. Danielsson, M. Liden, U. Eriksson, F. H. Nystrom y P. Stralfors (2007). "Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes." **FASEB J** 21(13): 3696-704.
- Oxenham, H. y N. Sharpe (2003). "Cardiovascular aging and heart failure." **Eur J Heart Fail** 5(4): 427-34.
- Padmanabhan, S., C. Hastie, D. Prabhakaran y A. F. Dominczak (2010). "Genomic approaches to coronary artery disease." **Indian J Med Res** 132(5): 567-78.
- Park, E., Y. Kyoung Park, S. M. Kim, H. J. Lee y M. H. Kang (2009). "Susceptibility to Oxidative Stress is Greater in Korean Patients with Coronary Artery Disease than Healthy Subjects." **J Clin Biochem Nutr** 45(3): 341-6.
- Parthasarathy, S., J. Barnett y L. G. Fong (1990). "High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein." **Biochim Biophys Acta** 1044(2): 275-83.
- Perez-Perez, R., F. J. Ortega-Delgado, E. Garcia-Santos, J. A. Lopez, E. Camafeita, W. Ricart, J. M. Fernandez-Real y B. Peral (2009). "Differential Proteomics of Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Reflects Their Unalike Biochemical and Metabolic Properties." **J Proteome Res** 8(4): 1682-93.
- Petersen, L., G. G. Nielsen, P. K. Andersen y T. I. Sorensen (2002). "Case-control study of genetic and environmental influences on premature death of adult adoptees." **Genet Epidemiol** 23(2): 123-32.

- Petriv, O. I. y R. A. Rachubinski (2004). "Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*." **J Biol Chem** 279(19): 19996-20001.
- Pezeshkian, M., M. Noori, H. Najjarpour-Jabbari, A. Abolfathi, M. Darabi, M. Shaaker y G. Shahmohammadi (2009). "Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue." **Metab Syndr Relat Disord** 7(2): 125-31.
- Pihlajaniemi, T., T. Helaakoski, K. Tasanen, R. Myllyla, M. L. Huhtala, J. Koivu y K. I. Kivirikko (1987). "Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene." **EMBO J** 6(3): 643-9.
- Pirola, L., A. M. Johnston y E. Van Obberghen (2004). "Modulation of insulin action." **Diabetologia** 47(2): 170-84.
- Plump, A. S., C. J. Scott y J. L. Breslow (1994). "Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(20): 9607-11.
- Poelmann, R. E., A. C. Gittenberger-de Groot, M. M. Mentink, R. Bokenkamp y B. Hogers (1993). "Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras." **Circ Res** 73(3): 559-68.
- Pond, C. M., C. A. Mattacks, P. C. Calder y J. Evans (1993). "Site-specific properties of human adipose depots homologous to those of other mammals." **Comp Biochem Physiol Comp Physiol** 104(4): 819-24.
- Pou, K. M., J. M. Massaro, U. Hoffmann, R. S. Vasan, P. Maurovich-Horvat, M. G. Larson, J. F. Keaney, Jr., J. B. Meigs, I. Lipinska, S. Kathiresan, J. M. Murabito, C. J. O'Donnell, E. J. Benjamin y C. S. Fox (2007). "Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study." **Circulation** 116(11): 1234-41.
- Pouliot, M. C., J. P. Despres, A. Nadeau, S. Moorjani, D. Prud'Homme, P. J. Lupien, A. Tremblay y C. Bouchard (1992). "Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels." **Diabetes** 41(7): 826-34.
- Prati, F., E. Arbustini, A. Labellarte, L. Sommariva, T. Pawlowski, A. Manzoli, A. Pagano, M. Motolese y A. Boccanelli (2003). "Eccentric atherosclerotic plaques with positive remodelling have a pericardial distribution: a permissive role of epicardial fat? A three-dimensional intravascular ultrasound study of left anterior descending artery lesions." **Eur Heart J** 24(4): 329-36.
- Prudovsky, I., F. Tarantini, M. Landriscina, D. Neivandt, R. Soldi, A. Kirov, D. Small, K. M. Kathir, D. Rajalingam y T. K. Kumar (2008). "Secretion without Golgi." **J Cell Biochem** 103(5): 1327-43.
- Pryde, M. M. y W. B. Kannel (2011). "Efficacy of dietary behavior modification for preserving cardiovascular health and longevity." **Cardiol Res Pract** 2011: 820457.
- Pyorala, K., M. Laakso y M. Uusitupa (1987). "Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view." **Diabetes Metab Rev** 3(2): 463-524.
- Quadro, L., W. S. Blaner, D. J. Salchow, S. Vogel, R. Piantedosi, P. Gouras, S. Freeman, M. P. Cosma, V. Colantuoni y M. E. Gottesman (1999). "Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein." **EMBO J** 18(17): 4633-44.
- Quadroni, M. y P. James (1999). "Proteomics and automation." **Electrophoresis** 20(4-5): 664-77.
- Rabilloud, T. (1990). "Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis." **Electrophoresis** 11(10): 785-94.

- Rabkin, S. W. (2007). "Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity." **Obes Rev** 8(3): 253-61.
- Radi, R., J. F. Turens, L. Y. Chang, K. M. Bush, J. D. Crapo y B. A. Freeman (1991). "Detection of catalase in rat heart mitochondria." **J Biol Chem** 266(32): 22028-34.
- Rajala, M. W., Y. Lin, M. Ranalletta, X. M. Yang, H. Qian, R. Gingerich, N. Barzilai y P. E. Scherer (2002). "Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule- $\alpha$  in adipose tissue." **Mol Endocrinol** 16(8): 1920-30.
- Ramalho, R. y C. Guimaraes (2008). "[The role of adipose tissue and macrophages in chronic inflammation associated with obesity: clinical implications]." **Acta Med Port** 21(5): 489-96.
- Ramprasad, T., P. Senthil Murugan, A. D. Prabakaran, P. Gomathi, A. Rathinavel y G. S. Selvam (2011). "Potential risk modifications of *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* (glutathione-S-transferases) variants and their association to CAD in patients with type-2 diabetes." **Biochem Biophys Res Commun** 407(1): 49-53.
- Rana, J. S., B. J. Arsenault, J. P. Despres, M. Cote, P. J. Talmud, E. Ninio, J. Wouter Jukema, N. J. Wareham, J. J. Kastelein, K. T. Khaw y S. Matthijs Boekholdt (2011). "Inflammatory biomarkers, physical activity, waist circumference, and risk of future coronary heart disease in healthy men and women." **Eur Heart J** 32(3): 336-44.
- Randolph, G. J. y M. B. Furie (1995). "A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro." **J Immunol** 155(7): 3610-8.
- Reaven, G. M. (2011). "The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round?" **J Intern Med** 269(2): 127-36.
- Reiner, L., A. Mazzoleni y F. L. Rodriguez (1955). "Statistical analysis of the epicardial fat weight in human hearts." **AMA Arch Pathol** 60(4): 369-73.
- Rhee, E. J., W. Y. Lee, C. Y. Park, K. W. Oh, B. J. Kim, K. C. Sung y B. S. Kim (2009). "The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults." **Eur J Endocrinol** 160(2): 165-72.
- Rial, E., M. Gonzalez-Barroso, C. Fleury, S. Iturrizaga, D. Sanchis, J. Jimenez-Jimenez, D. Ricquier, M. Goubern y F. Bouillaud (1999). "Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins *UCP1* and *UCP2*." **EMBO J** 18(21): 5827-33.
- Rissanen, J., R. Hudson y R. Ross (1994). "Visceral adiposity, androgens, and plasma lipids in obese men." **Metabolism** 43(10): 1318-23.
- Roelofs, H., M. Dijkstra, D. Weening, M. P. de Vries, A. Hoek y R. J. Vonk (2009). "Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates (*CILAIR*) provides a quantitative method to study tissue secretomes." **Mol Cell Proteomics** 8(2): 316-24.
- Roh, S. G., S. H. Song, K. C. Choi, K. Katoh, V. Wittamer, M. Parmentier y S. Sasaki (2007). "Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor." **Biochem Biophys Res Commun** 362(4): 1013-8.
- Romero-Corral, A., V. M. Montori, V. K. Somers, J. Korinek, R. J. Thomas, T. G. Allison, F. Mookadam y F. Lopez-Jimenez (2006). "Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies." **Lancet** 368(9536): 666-78.
- Rong, R., S. Ramachandran, M. Penumetcha, N. Khan y S. Parthasarathy (2002). "Dietary oxidized fatty acids may enhance intestinal apolipoprotein A-I production." **J Lipid Res** 43(4): 557-64.

- Rosenfeld, M. E., S. Yla-Herttuala, B. A. Lipton, V. A. Ord, J. L. Witztum y D. Steinberg (1992). "Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans." **Am J Pathol** 140(2): 291-300.
- Rubin, E. M., R. M. Krauss, E. A. Spangler, J. G. Verstuyft y S. M. Clift (1991). "Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI." **Nature** 353(6341): 265-7.
- Sacks, H. S. y J. N. Fain (2007). "Human epicardial adipose tissue: a review." **Am Heart J** 153(6): 907-17.
- Saku, K., M. Ahmad, P. Glas-Greenwalt y M. L. Kashyap (1985). "Activation of fibrinolysis by apolipoproteins of high density lipoproteins in man." **Thromb Res** 39(1): 1-8.
- Santos-Gallego, C. G., B. Ibanez y J. J. Badimon (2008). "HDL-cholesterol: is it really good? Differences between apoA-I and HDL." **Biochem Pharmacol** 76(4): 443-52.
- Saren, P., H. G. Welgus y P. T. Kovanen (1996). "TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages." **J Immunol** 157(9): 4159-65.
- Scarabin, P. Y., A. M. Vissac, J. M. Kirzin, P. Bourgeat, J. Amiral, R. Agher y L. Guize (1996). "Population correlates of coagulation factor VII. Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated factor VII." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 16(9): 1170-6.
- Schaffler, A., M. Neumeier, H. Herfarth, A. Furst, J. Scholmerich y C. Buchler (2005). "Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue." **Biochim Biophys Acta** 1732(1-3): 96-102.
- Scherer, P. E. (2006). "Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ." **Diabetes** 55(6): 1537-45.
- Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini y H. F. Lodish (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." **J Biol Chem** 270(45): 26746-9.
- Schoonjans, K., B. Staels y J. Auwerx (1996). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression." **J Lipid Res** 37(5): 907-25.
- Schriner, S. E., N. J. Linford, G. M. Martin, P. Treuting, C. E. Ogburn, M. Emond, P. E. Coskun, W. Ladiges, N. Wolf, H. Van Remmen, D. C. Wallace y P. S. Rabinovitch (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." **Science** 308(5730): 1909-11.
- Semenza, G. L. (1998). "Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis." **Curr Opin Genet Dev** 8(5): 588-94.
- Sever, P. S., B. Dahlöf, N. R. Poulter, H. Wedel, G. Beevers, M. Caulfield, R. Collins, S. E. Kjeldsen, A. Kristinsson, G. T. McInnes, J. Mehlsen, M. Nieminen, E. O'Brien y J. Ostergren (2003). "Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial." **Lancet** 361(9364): 1149-58.
- Severino, A., M. Campioni, S. Straino, F. N. Salloum, N. Schmidt, U. Herbrand, S. Frede, G. Toietta, G. Di Rocco, R. Bussani, F. Silvestri, M. Piro, G. Liuzzo, L. M. Biasucci, P. Mellone, F. Feroce, M. Capogrossi, F. Baldi, J. Fandrey, M. Ehrmann, F. Crea, A. Abbate y A. Baldi (2007). "Identification of protein disulfide isomerase as a

cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy." **J Am Coll Cardiol** 50(11): 1029-37.

Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley y C. A. Dowd (2001). "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily." **Biochem J** 360(Pt 1): 1-16.

Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm y M. Mann (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." **Anal Chem** 68(5): 850-8.

Shimabukuro, M. (2009). "Cardiac adiposity and global cardiometabolic risk: new concept and clinical implication." **Circ J** 73(1): 27-34.

Shirani, J., K. Berezowski y W. C. Roberts (1995). "Quantitative measurement of normal and excessive (cor adiposum) subepicardial adipose tissue, its clinical significance, and its effect on electrocardiographic QRS voltage." **Am J Cardiol** 76(5): 414-8.

Sidhu, R. S. (1979). "Two-dimensional electrophoretic analyses of proteins synthesized during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." **J Biol Chem** 254(21): 11111-8.

Sierra-Johnson, J., A. Romero-Corral, V. K. Somers, F. Lopez-Jimenez, A. Malarstig, K. Brismar, A. Hamsten, R. M. Fisher y M. L. Hellenius (2009). "IGF-1/IGFBP-3 ratio: a mechanistic insight into the metabolic syndrome." **Clin Sci (Lond)** 116(6): 507-12.

Siiteri, P. K. (1987). "Adipose tissue as a source of hormones." **Am J Clin Nutr** 45(1 Suppl): 277-82.

Singh, I. M., M. H. Shishehbor y B. J. Ansell (2007). "High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review." **JAMA** 298(7): 786-98.

Sjostrom, L., H. Kvist, A. Cederblad y U. Tylen (1986). "Determination of total adipose tissue and body fat in women by computed tomography, 40K, and tritium." **Am J Physiol** 250(6 Pt 1): E736-45.

Skalnikova, H., J. Motlik, S. J. Gadher y H. Kovarova (2011). "Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines." **Proteomics** 11(4): 691-708.

Smejkal, G. B., M. H. Robinson y A. Lazarev (2004). "Comparison of fluorescent stains: relative photostability and differential staining of proteins in two-dimensional gels." **Electrophoresis** 25(15): 2511-9.

Solini, A., E. Santini, S. Madec, C. Rossi y E. Muscelli (2009). "Retinol-binding protein-4 in women with untreated essential hypertension." **Am J Hypertens** 22(9): 1001-6.

Sons, H. U. y V. Hoffmann (1986). "Epicardial fat cell size, fat distribution and fat infiltration of the right and left ventricle of the heart." **Anat Anz** 161(5): 355-73.

Spiegelman, B. M., P. Puigserver y Z. Wu (2000). "Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1." **Int J Obes Relat Metab Disord** 24 Suppl 4: S8-10.

Spiroglou, S. G., G. K. C, N. V. J y H. P. H (2010). "Adipokines in Periaortic and Epicardial Adipose Tissue: Differential Expression and Relation to Atherosclerosis." **J Atheroscler Thromb** 17: 115-130.

Stary, H. C., D. H. Blankenhorn, A. B. Chandler, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. Richardson, M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner y et al. (1992). "A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." **Arterioscler Thromb** 12(1): 120-34.

- Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner y R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 15(9): 1512-31.
- Stary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner y R. W. Wissler (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." **Arterioscler Thromb** 14(5): 840-56.
- Stenvinkel, P. (2000). "Leptin and blood pressure--is there a link?" **Nephrol Dial Transplant** 15(8): 1115-7.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima y M. A. Lazar (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." **Nature** 409(6818): 307-12.
- Stocker, R. y J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." **Physiol Rev** 84(4): 1381-478.
- Streeter, G. L. (1949). "Developmental horizons in human embryos; a review of the histogenesis of cartilage and bone." **Contrib Embryol** 33(213-221): 149-68.
- Swifka, J., J. Weiss, K. Addicks, J. Eckel y P. Rosen (2008). "Epicardial fat from guinea pig: a model to study the paracrine network of interactions between epicardial fat and myocardium?" **Cardiovasc Drugs Ther** 22(2): 107-14.
- Taguchi, R., J. Takasu, Y. Itani, R. Yamamoto, K. Yokoyama, S. Watanabe y Y. Masuda (2001). "Pericardial fat accumulation in men as a risk factor for coronary artery disease." **Atherosclerosis** 157(1): 203-9.
- Takahashi, Y., S. Takahashi, T. Yoshimi y T. Miura (1998). "Hypoxia-induced expression of phosphoglycerate mutase B in fibroblasts." **Eur J Biochem** 254(3): 497-504.
- Tamminen, M., G. Mottino, J. H. Qiao, J. L. Breslow y J. S. Frank (1999). "Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 19(4): 847-53.
- Tamori, Y., H. Sakaue y M. Kasuga (2006). "RBP4, an unexpected adipokine." **Nat Med** 12(1): 30-1; discussion 31.
- Tansey, D. K., Z. Aly y M. N. Sheppard (2005). "Fat in the right ventricle of the normal heart." **Histopathology** 46(1): 98-104.
- Tatemoto, K., M. Hosoya, Y. Habata, R. Fujii, T. Kakegawa, M. X. Zou, Y. Kawamata, S. Fukusumi, S. Hinuma, C. Kitada, T. Kurokawa, H. Onda y M. Fujino (1998). "Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor." **Biochem Biophys Res Commun** 251(2): 471-6.
- Tchernof, A. (2007). "Visceral adipocytes and the metabolic syndrome." **Nutr Rev** 65(6 Pt 2): S24-9.
- Tedgui, A. y Z. Mallat (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." **Physiol Rev** 86(2): 515-81.
- Teijeira-Fernandez, E., S. Eiras, L. Grigorian-Shamagian, A. Fernandez, B. Adrio y J. R. Gonzalez-Juanatey (2008). "Epicardial adipose tissue expression of adiponectin is lower in patients with hypertension." **J Hum Hypertens** 22(12): 856-63.
- Tian, F., X. Zhou, J. Wikstrom, H. Karlsson, H. Sjolund, L. M. Gan, J. Boren y L. M. Akyurek (2009). "Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells



in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 297(3): H1078-86.

Tiraby, C., G. Tavernier, C. Lefort, D. Larrouy, F. Bouillaud, D. Ricquier y D. Langin (2003). "Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes." **J Biol Chem** 278(35): 33370-6.

Tomas, P., J. Jimenez-Jimenez, P. Zaragoza, V. Vuligonda, R. A. Chandraratna y E. Rial (2004). "Activation by retinoids of the uncoupling protein UCP1." **Biochim Biophys Acta** 1658(1-2): 157-64.

Trayhurn, P. (2007). "Adipocyte biology." **Obes Rev** 8 Suppl 1: 41-4.

Tsuchida, A., T. Yamauchi, S. Takekawa, Y. Hada, Y. Ito, T. Maki y T. Kadowaki (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination." **Diabetes** 54(12): 3358-70.

Tsutsumi, C., M. Okuno, L. Tannous, R. Piantadosi, M. Allan, D. S. Goodman y W. S. Blaner (1992). "Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes." **J Biol Chem** 267(3): 1805-10.

Ueno, H., H. Koyama, T. Shoji, M. Monden, S. Fukumoto, S. Tanaka, Y. Otsuka, Y. Mima, T. Morioka, K. Mori, A. Shioi, H. Yamamoto, M. Inaba y Y. Nishizawa (2010). "Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherogenesis in apoE-deficient mouse." **Atherosclerosis** 211(2): 431-6.

Ueno, K., T. Anzai, M. Jinzaki, M. Yamada, Y. Jo, Y. Maekawa, A. Kawamura, T. Yoshikawa, Y. Tanami, K. Sato, S. Kuribayashi y S. Ogawa (2009). "Increased epicardial fat volume quantified by 64-multidetector computed tomography is associated with coronary atherosclerosis and totally occlusive lesions." **Circ J** 73(10): 1927-33.

Unlu, M., M. E. Morgan y J. S. Minden (1997). "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts." **Electrophoresis** 18(11): 2071-7.

Vague, J. (1956). "The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease." **Am J Clin Nutr** 4(1): 20-34.

van der Wal, A. C., A. E. Becker, C. M. van der Loos y P. K. Das (1994). "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology." **Circulation** 89(1): 36-44.

Van Gaal, L. F., I. L. Mertens y C. E. De Block (2006). "Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease." **Nature** 444(7121): 875-80.

Vander Heiden, M. G., J. W. Locasale, K. D. Swanson, H. Sharfi, G. J. Heffron, D. Amador-Noguez, H. R. Christofk, G. Wagner, J. D. Rabinowitz, J. M. Asara y L. C. Cantley (2010). "Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells." **Science** 329(5998): 1492-9.

Vazquez-Vela, M. E., N. Torres y A. R. Tovar (2008). "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity." **Arch Med Res** 39(8): 715-28.

Verghese, P. B., E. L. Arrese y J. L. Soulages (2007). "Stimulation of lipolysis enhances the rate of cholesterol efflux to HDL in adipocytes." **Mol Cell Biochem** 302(1-2): 241-8.

- Verhagen, S. N. y F. L. Visseren (2011). "Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis." **Atherosclerosis** 214(1): 3-10.
- Vijayagopal, P., S. R. Srinivasan, B. Radhakrishnamurthy y G. S. Berenson (1992). "Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages." **Arterioscler Thromb** 12(2): 237-49.
- Vijayagopal, P., S. R. Srinivasan, J. H. Xu, E. R. Dalferes, Jr., B. Radhakrishnamurthy y G. S. Berenson (1993). "Lipoprotein-proteoglycan complexes induce continued cholesteryl ester accumulation in foam cells from rabbit atherosclerotic lesions." **J Clin Invest** 91(3): 1011-8.
- Villaret, A., J. Galitzky, P. Decaunes, D. Esteve, M. A. Marques, C. Sengenès, P. Chiotasso, T. Tchkonja, M. Lafontan, J. L. Kirkland y A. Bouloumie (2010). "Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence." **Diabetes** 59(11): 2755-63.
- Virtanen, K. A., P. Lonnroth, R. Parkkola, P. Peltoniemi, M. Asola, T. Viljanen, T. Tolvanen, J. Knuuti, T. Ronnema, R. Huupponen y P. Nuutila (2002). "Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans." **J Clin Endocrinol Metab** 87(8): 3902-10.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." **Endocr Rev** 21(6): 697-738.
- Wake, R. y M. Yoshiyama (2009). "Gender differences in ischemic heart disease." **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov** 4(3): 234-40.
- Walsh, A., Y. Ito y J. L. Breslow (1989). "High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3." **J Biol Chem** 264(11): 6488-94.
- Wang, H., H. M. Berschneider, J. Du y D. D. Black (1997). "Apolipoprotein secretion and lipid synthesis: regulation by fatty acids in newborn swine intestinal epithelial cells." **Am J Physiol** 272(5 Pt 1): G935-42.
- Wang, L., D. G. Fast y A. D. Attie (1997). "The enzymatic and non-enzymatic roles of protein-disulfide isomerase in apolipoprotein B secretion." **J Biol Chem** 272(44): 27644-51.
- Wang, P., E. Mariman, J. Keijer, F. Bouwman, J. P. Noben, J. Robben y J. Renes (2004). "Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines." **Cell Mol Life Sci** 61(18): 2405-17.
- Ward, M. R., A. Jeremias, K. Hibi, N. A. Herity, S. T. Lo, S. D. Filardo, D. P. Lee, P. J. Fitzgerald y A. C. Yeung (2001). "The influence of plaque orientation (pericardial or myocardial) on coronary arterial remodeling." **Atherosclerosis** 154(1): 179-83.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel y A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." **J Clin Invest** 112(12): 1796-808.
- Wheeler, G. L., R. Shi, S. R. Beck, C. D. Langefeld, L. Lenchik, L. E. Wagenknecht, B. I. Freedman, S. S. Rich, D. W. Bowden, M. Y. Chen y J. J. Carr (2005). "Pericardial and visceral adipose tissues measured volumetrically with computed tomography are highly associated in type 2 diabetic families." **Invest Radiol** 40(2): 97-101.
- Wilcox, J. N., K. M. Smith, S. M. Schwartz y D. Gordon (1989). "Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque." **Proc Natl Acad Sci U S A** 86(8): 2839-43.

- Williams, K. J. y I. Tabas (1995). "The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 15(5): 551-61.
- Wood, I. S., F. P. de Heredia, B. Wang y P. Trayhurn (2009). "Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity." **Proc Nutr Soc** 68(4): 370-7.
- Wu, A. L. y H. G. Windmueller (1979). "Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat." **J Biol Chem** 254(15): 7316-22.
- Wu, H., L. Wei, Y. Bao, J. Lu, P. Huang, Y. Liu, W. Jia y K. Xiang (2009). "Fenofibrate reduces serum retinol-binding protein-4 by suppressing its expression in adipose tissue." **Am J Physiol Endocrinol Metab** 296(4): E628-34.
- Xavier-Neto, J., M. D. Shapiro, L. Houghton y N. Rosenthal (2000). "Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart." **Dev Biol** 219(1): 129-41.
- Xu, P., D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley y J. Peng (2009). "Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation." **Cell** 137(1): 133-45.
- Yamashita, S., K. Tsubakio-Yamamoto, T. Ohama, Y. Nakagawa-Toyama y M. Nishida (2010). "Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions." **J Atheroscler Thromb** 17(5): 436-51.
- Yang, Q., T. E. Graham, N. Mody, F. Preitner, O. D. Peroni, J. M. Zabolotny, K. Kotani, L. Quadro y B. B. Kahn (2005). "Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." **Nature** 436(7049): 356-62.
- Yang, R. Z., M. J. Lee, H. Hu, J. Pray, H. B. Wu, B. C. Hansen, A. R. Shuldiner, S. K. Fried, J. C. McLenithan y D. W. Gong (2006). "Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action." **Am J Physiol Endocrinol Metab** 290(6): E1253-61.
- Yang, Y., J. Wang, D. Bu, L. Zhang, S. Li, L. Zhou y H. Wei (2011). "A fluorescence-based Coomassie Blue protocol for two-dimensional gel-based proteomics." **Biotechnol Lett** 33(1): 119-21.
- Yla-Herttuala, S., T. Solakivi, J. Hirvonen, H. Laaksonen, M. Mottonen, E. Pesonen, J. Raekallio, H. K. Akerblom y T. Nikkari (1987). "Glycosaminoglycans and apolipoproteins B and A-I in human aortas. Chemical and immunological analysis of lesion-free aortas from children and adults." **Arteriosclerosis** 7(4): 333-40.
- Yu, Y. H. y H. N. Ginsberg (2005). "Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue." **Circ Res** 96(10): 1042-52.
- Yui, Y., T. Aoyama, H. Morishita, M. Takahashi, Y. Takatsu y C. Kawai (1988). "Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I." **J Clin Invest** 82(3): 803-7.
- Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu, L. Bautista, M. G. Franzosi, P. Commerford, C. C. Lang, Z. Rumboldt, C. L. Onen, L. Lisheng, S. Tanomsup, P. Wangai, Jr., F. Razak, A. M. Sharma y S. S. Anand (2005). "Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study." **Lancet** 366(9497): 1640-9.
- Zannis, V. I., F. S. Cole, C. L. Jackson, D. M. Kurnit y S. K. Karathanasis (1985). "Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages." **Biochemistry** 24(16): 4450-5.
- Zdravkovic, S., A. Wienke, N. L. Pedersen, M. E. Marenberg, A. I. Yashin y U. De Faire (2002). "Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins." **J Intern Med** 252(3): 247-54.

- Zhang, J., L. Yu, Q. Fu, J. Gao, Y. Xie, J. Chen, P. Zhang, Q. Liu y S. Zhao (2001). "Mouse phosphoglycerate mutase M and B isozymes: cDNA cloning, enzyme activity assay and mapping." **Gene** 264(2): 273-9.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold y J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." **Nature** 372(6505): 425-32.
- Zhong, J., S. A. Krawczyk, R. Chaerkady, H. Huang, R. Goel, J. S. Bader, G. W. Wong, B. E. Corkey y A. Pandey (2010). "Temporal profiling of the secretome during adipogenesis in humans." **J Proteome Res** 9(10): 5228-38.
- Zhou, Q. y J. K. Liao (2009). "Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy." **Curr Pharm Des** 15(5): 467-78.
- Zhou, Q. G., X. Peng, L. L. Hu, D. Xie, M. Zhou y F. F. Hou (2010). "Advanced oxidation protein products inhibit differentiation and activate inflammation in 3T3-L1 preadipocytes." **J Cell Physiol** 225(1): 42-51.
- Zhou, Y., Y. Wei, L. Wang, X. Wang, X. Du, Z. Sun, N. Dong y X. Chen (2011). "Decreased Adiponectin and Increased Inflammation Expression in Epicardial Adipose Tissue in Coronary Artery Disease." **Cardiovasc Diabetol** 10(1): 2.
- Zimmet, P., D. Magliano, Y. Matsuzawa, G. Alberti y J. Shaw (2005). "The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition." **J Atheroscler Thromb** 12(6): 295-300.
- Zvonic, S., M. Lefevre, G. Kilroy, Z. E. Floyd, J. P. DeLany, I. Kheterpal, A. Gravois, R. Dow, A. White, X. Wu y J. M. Gimble (2007). "Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis." **Mol Cell Proteomics** 6(1): 18-28.

ABREVIATURAS  
Y  
ANEXOS



## ABREVIATURAS

1DE: Electroforesis mono-dimensional en gel desnaturalizante de poli-acrilamida  
 2DE: Electroforesis bi-dimensional en gel desnaturalizante de poli-acrilamida  
 ABCA1: *ATP binding cassette transporter-1*  
 ACC1: Acetil coenzima A carboxilasa  
 ACTB:  $\beta$ -actina  
 ADN: Ácido desoxirribonucleico  
 AGE: Productos de glicación avanzada  
 AKT: Serina-treonina quinasa  
 APOA1: Apolipoproteína A-1  
 APOB-100: Apolipoproteína B-100  
 APOE: Apolipoproteína E  
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
 AT1: Receptor de angiotensina II tipo 1  
 ATGL: Lipasa de triglicéridos del tejido adiposo  
 BLAST: Herramienta de búsqueda de alineamiento de secuencias de tipo local  
 CATA: Catalasa  
 CCR2: *Chemokine (C-C motif) receptor 2*  
 CHAPS: *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate*  
 CI: Cardiopatía isquémica  
 CILAIR: Comparación de tasas de incorporación de aminoácidos marcados con un isótopo  
 CLIC: Canal intracelular de cloro  
 CR: Cantidad relativa  
 Ct: Ciclo en el cual se supera un umbral  
 CXCR3: *Chemokine (C-X-C motif) receptor 3*  
 DAG: Di-acil-glicerol  
 DIGE: Electroforesis diferencial en gel  
 DPI: *Diphenylene iodonium*  
 DTT: *Dithiothreitol*  
 ECL: Potenciador de quimioluminiscencia  
 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
 EGF: Factor de crecimiento endotelial  
 EIA: Ensayo inmunoenzimático  
 ELISA: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas  
 EPIC: Investigación prospectiva europea sobre el cáncer  
 FABP: Proteína de unión a ácidos grasos  
 FACS: Citometría de flujo (*Fluorescence-activated cell sorting*).  
 FAS: Sintasa de ácidos grasos  
 FATP: Proteína transportadora de ácidos grasos  
 FGF: Factor crecimiento de fibroblastos  
 FWHM: Anchura a media altura del pico de detección  
 GLUT4: Receptor de glucosa inducible por insulina  
 GSTP1: Glutación S-Transferasa P  
 HDL: Lipoproteínas de alta densidad  
 HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*  
 HIF: Factor inducible por hipoxia  
 HOPE: *Heart Outcomes Protection Evaluation*

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia  
HSL: Lipasa sensible a hormonas  
ICAT: Marcaje de afinidad codificado por isótopos  
IF: Interferón  
IL: Interleuquina  
IMC: Índice de masa corporal  
IPG: Gradiente de pH inmovilizado  
IRS: Sustrato del receptor de insulina  
iTRAQ: Marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa  
KO: *Knock out*  
LAC: Cromatografía de afinidad con lectinas  
LC: Cromatografía Líquida  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
LPL: Lipoproteína lipasa  
LPS: Lipopolisacárido  
LSAB: Marcaje con estreptavidina-biotina  
LTQ FTs: Trampa lineal de iones combinada con resonancia de iones en ciclotrón transformado de Fourier  
LTQ: Trampa lineal de iones  
MALDI: Desorción e ionización por láser asistida por matriz  
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1  
M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos  
MGL: Monoglicérido lipasa  
MMLV: *Moloney murine leukemia virus*  
MMP: Metaloproteinasa de matriz  
MS: Espectrometría de masas  
MTP/MTTP: Proteína de transferencia de triglicéridos microsomal  
NADPH: Nicotinamida adenina di-nucleótido fosfato  
NBT: Azul nitro-tetrazolio cloruro  
NCI: Sin cardiopatía isquémica  
NFκB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NL: Rango no lineal  
NPRA: Péptidos natriuréticos  
P4H: Prolil-4-hidroxilasa  
PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1  
PCR: Proteína C Reactiva  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PDI: Proteína disulfuro isomerasa  
PDO: Pico de densidad óptica  
PEG: Polietilenglicol  
PGAM: Fosfoglicerato mutasa  
Pm: Peso molecular  
PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*  
PRIME: Estudio epidemiológico prospectivo sobre infarto de miocardio  
PSS: Solución salina fisiológica  
PVDF: Difluoruro de polivinilideno  
QTOF: Tiempo de vuelo a través de cuadrupolo  
RAGE: Receptor de productos de glicación avanzada  
RALDH2: Retinaldehído deshidrogenada tipo 2



RBP4: Proteína de unión al retinol 4  
RM: Resonancia magnética  
ROS: Especies reactivas del oxígeno  
RT-PCR: Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa  
SDS: Dodecilsulfato sódico  
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poli-acrilamida desnaturalizante  
SELDI: Desorción e ionización por láser realizada por superficie  
SILAC: Marcaje de aminoácidos con isótopos estables para cultivo celular  
SPARC: Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)  
TA: Tejido adiposo  
TAE: Tejido adiposo epicárdico  
TAO: Tejido adiposo omental  
TAPV: Tejido adiposo perivascular  
TAS: Tejido adiposo subcutáneo  
TAV: Tejido adiposo visceral  
TBS-T: Solución tampón de Tris con Tween 20  
TC: Tomografía computerizada  
TF: Factor tisular  
TFG $\beta$ : Factor de crecimiento transformante- $\beta$   
TNF $\alpha$ : Factor  $\alpha$  de necrosis tumoral  
TOF: Tiempo de vuelo  
UCP: Proteína desacoplante  
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas  
VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1  
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

**ANEXO 1. TABLA DE CEBADORES Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN**

Gen	Número de acceso	Cebadores	S αS	(5'→3')	TH	Ext	pb	TM
ACTB	NM_001101.2	TTCTGACCCATGCCCACCAT ATGGATGATGATATCGCCGCGCTC			N	N	198	87°C
APOA1	NM_000039.1	TGGATGTGCTCAAAGACAGC AGGCCCTCTGTCTCCTTTTC			60°C, 30''	No	190	82°C
CAT	NM_001572.2	GCCTGGGACCCAATTATCTT GAATCTCCGCACTTCTCCAG			58°C, 1'	72°C, 1'	203	82°C
CLIC1	NM_001288.4	CAGCTCTGAACCCTGAGTCC TGCCATCCAAAACTTCCTC			60°C, 30''	No	222	79°C
FABP4	NM_001442.2	TACTGGGCCAGGAATTTGAC GTGGAAGTGACGCCTTTCAT			60°C, 30''	No	181	79°C
GLUT4	NM_001042.2	CTTCGAGACAGCAGGGGTAG AGGAGCAGAGCCACAGTCAT			60°C, 30''	No	180	83°C
GSTP1	NM_000852.2	CACTCAAAGCCTCCTGCCTA GATGTATTTGCAGCGGAGGT			60°C, 30''	No	188	84°C
P4HB	NM_000918.3	CTCGACAAAGATGGGGTTGT GCAAGAACAGCAGGATGTGA			60°C, 30''	No	193	80°C
PGAM1	NM_002629.2	GGAGGGGAAACGTGTACTGA TCTTCATCCCCCAGAACTG			60°C, 30''	No	183	81°C
RBP4	NM_006744.3	ACCCTGCCAAGTTCAAGATG CGGGAAAACACGAAGGAGTA			60°C, 30''	No	172	82°C

Sentido/anti-sentido (S/αS); Temperatura de Hibridación (TH); Extensión (Ext); Amplitud del fragmento en pares de bases (pb); Temperatura de Melting (TM); Gen utilizado como control de normalización (N)

## ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS GLOBALES LA POBLACIÓN USADA

CARACTERÍSTICAS	n(%) / Media±DE
<i>Demográficos</i>	
Sexo ♂	66 (62,9%)
Edad	71,29±8,56
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,98±4,34
Hipertensión	80 (79,2%)
Diabetes	29 (28,7%)
Hiperlipidemia	57 (56,4%)
Cardiopatía isquémica	53 (51,5%)
<i>Análisis de Laboratorio</i>	
Triglicéridos (mg/dL)	133,15±54,94
Colesterol total (mg/dL)	176,98±40,41
Glucosa (mg/dL)	110,76±31,61
<b>TOTAL</b>	<b>105</b>

### ANEXO 3. PUBLICACIONES

El trabajo presentado ha dado lugar a la publicación del artículo titulado “*Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress*” [[A Salgado-Somoza](#), E Teijeira-Fernández, AL Fernández, JR González-Juanatey y S Eiras. (2010) **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**; 299(1): H202-9]

Asimismo, a partir del presente trabajo han sido enviados y se encuentran en revisión otros dos artículos con los siguientes títulos iniciales: “*Changes in lipid transport-involved proteins of epicardial adipose tissue associated with coronary artery disease*” y “*Coronary artery disease is associated to higher epicardial RBP4 and lower GLUT4 levels in epicardial and subcutaneous adipose tissue*”.

Durante la etapa de tesis, el doctorando ha participado en la realización de los artículos que se indican a continuación por orden cronológico inverso:

- “*Lower epicardial adipose tissue adiponectin in patients with metabolic syndrome.*” E Teijeira-Fernández, S Eiras, L Grigorian-Shamagian, [A Salgado-Somoza](#), C Delgado y JR González-Juanatey. (2011) **Cytokine**; 54(2): 185-90.

- “*Receptor for advanced glycation end-products expression in subcutaneous adipose tissue is related to coronary artery disease.*” BK Rodiño-Janeiro\*, [A Salgado-Somoza](#)\*, E Teijeira-Fernández, JR González-Juanatey, Álvarez E y Eiras S (\*Co-autores). (2011) **European Journal of Endocrinology** ; 164 (4): 529-37.

- “*Relationship between epicardial adipose tissue adipocyte size and MCP-1 expression.*” S Eiras, E Teijeira-Fernández, [A Salgado-Somoza](#), E Couso, T García-Caballero, J Sierra, JR González-Juanatey. (2010) **Cytokine**; 51(2):207-12.

- “*High-resolution two-dimensional gel electrophoresis analysis of atrial tissue proteome reveals down-regulation of fibulin-1 in atrial fibrillation.*” A García, S Eiras, AF Parguñá, J Alonso, I Rosa, [A Salgado-Somoza](#), TY Rico, E Teijeira-Fernández; JR González-Juanatey. (2010) **International Journal of Cardiology**; Aceptado para publicación

○ “*Diabetic and nondiabetic patients express similar adipose tissue adiponectin and leptin levels*” E Teijeira-Fernández, S Eiras, L Grigorian-Shamagian, A Salgado-Somoza, JM Martínez-Comendador y JR González-Juanatey. (2010) **International Journal of Obesity (London)**; 34(7):1200-8.

○ “*Lack of effect of the ghrelin gene-derived peptide obestatin on cardiomyocyte viability and metabolism.*” MJ Iglesias, A Salgado, R Piñeiro, BK Rodiño, M Otero, L Grigorian, R Gallego, C Diéguez, O Gualillo, JR González-Juanatey y F Lago. (2007) **Journal of Endocrinological Investigation**; 30(6): 470-6.